

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Génie des procédés et de l'environnement

Présentée et soutenue par :
Joyce KHEIR

le : vendredi 30 novembre 2012

Titre :

Evaluation du risque Brettanomyces dans le vignoble libanais et étude cinétique de la bioconversion de l'acide p-coumarique en 4-éthylphénol

Ecole doctorale :
Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
Laboratoire de Génie Chimique - UMR5503

Directeur(s) de Thèse :
Cédric BRANDAM, Maitre de conférences, Université de Toulouse, Directeur de thèse
Roger LTEIF Professeur des Universités, Université Saint-Joseph, Co-directeur de thèse

Rapporteurs :
Aline LONVAUD-FUNEL Professeur des Universités, Université Victor Segalen Bordeaux 2
Rachad SALIBA Professeur des Universités, Université Libanaise

Membre(s) du jury :
Aline LONVAUD-FUNEL Professeur des Universités, Université Victor Segalen Bordeaux 2
Cédric BRANDAM, Maitre de conférences, Université de Toulouse, Directeur de thèse
Roger LTEIF Professeur des Universités, Université Saint-Joseph, Co-directeur de thèse
Rachad SALIBA Professeur des Universités, Université Libanaise
Yvan JOBARD, Expert OEnologue

N° d'ordre :.....

THESE

Présentée pour obtenir les titres de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Mécanique énergétique génie civil et procédés
Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement

ET

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE SAINT JOSEPH DE BEYROUTH

École doctorale : Sciences et Santé
Spécialité : Chimie

Par Joyce KHEIR

**Evaluation du risque *Brettanomyces* dans le vignoble libanais et
étude cinétique de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique
en 4-éthylphénol**

Soutenue le 30 Novembre 2012, devant le jury composé de :

Mme Aline LONVAUD-FUNEL	Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2	Rapporteur
M. Rachad SALIBA	Professeur, Université Libanaise	Rapporteur
M. Roger LTEIF	Professeur, Université Saint-Joseph	Directeur de thèse
M. Cédric BRANDAM	Maitre de conférences, Université de Toulouse	Directeur de thèse
M. Dominique SALAMEH	Maitre de conférences, Université Saint-Joseph	Examineur
M. Yvan JOBARD	Œnologue	Examineur
M. Pierre STREHAIANO	Professeur, Université de Toulouse	Membre
M. Toufic RIZK	Professeur, Université Saint-Joseph	Membre

Les altérations sensorielles des vins dues à la présence des levures du genre *Brettanomyces* se caractérisent par une augmentation de la teneur en phénols volatils tel que le 4-éthylphénol. Le premier objectif de ce travail était de faire un état des lieux sur le risque « éthylphénol » au Liban en s'intéressant à la présence d'un précurseur (acide *p*-coumarique), du microorganisme responsable (*Brettanomyces*) et du produit final (4-éthylphénol) dans les vins élaborés dans ce pays. Une forte hétérogénéité de concentrations en acide *p*-coumarique a été observée avec des valeurs variant de 0 à 31,4 mg.L⁻¹. Des niveaux importants de 4-éthylphénols de l'ordre de 1,367 mg.L⁻¹ ont été détectés sur certains vins. Un dépistage du contaminant microbien a permis de confirmer pour la première fois la présence de *Brettanomyces* au Liban, les proportions restant toutefois assez faibles (3 % des échantillons testés). Une étude génétique a caractérisé les souches retenues qui se sont montrées diverses au sein de l'espèce. Le travail a porté ensuite sur l'analyse cinétique des étapes réactionnelles constituant le processus enzymatique de la bioconversion des substrats acide *p*-coumarique et 4-vinylphénol en 4-éthylphénol pour 5 souches de *Brettanomyces bruxellensis* d'origines libanaises et françaises. La variabilité entre les souches s'est exprimée aux niveaux génétique et cinétique. Des profils hétérogènes de bioréaction ont été mis en évidence en fonction de la nature des souches. L'analyse du bilan-matière a révélé l'existence probable de phénomènes d'adsorption sur les parois des *Brettanomyces* qui sont souche-dépendants. La dernière partie a été consacrée à l'évaluation du lien entre quantité de biomasse et production de 4-éthylphénol ainsi qu'à l'influence de quelques paramètres environnementaux (pH, source d'ammonium et milieu de culture) sur la cinétique réactionnelle.

Mots-clés: vin libanais, *Brettanomyces bruxellensis*, PCR, séquençage génétique, acide *p*-coumarique, 4-vinylphénol, 4-éthylphénol, adsorption, cinétique.

Abstract

Wine sensory alterations due to the presence of *Brettanomyces* yeasts are characterized by an increased content of volatile phenols such as 4-ethylphenol. The first aim of this work was to make an inventory of the "ethylphenol" risks in Lebanon by focusing on the presence of one precursor (*p*-coumaric acid), the microorganism provoking these risks (*Brettanomyces*) and the final product (4-ethylphenol) in wines produced in this country. High heterogeneity of *p*-coumaric acid concentration was observed with values ranging from 0 to 31,4 mg.L⁻¹. Significant levels of 4-ethylphenols of about 1,367 mg L⁻¹ have been detected in some wines. Screening of microbial contaminants confirmed the presence of *Brettanomyces* for the first time in Lebanon, with proportions remaining relatively low (3 % of samples tested). A genetic study has characterized the selected strains which are shown to be various within the species. The second objective of this study was the kinetic analysis of the reaction steps constituting the bioconversion enzymatic process of both substrates *p*-coumaric acid and 4-vinylphenol into 4-ethylphenol for 5 strains of *Brettanomyces bruxellensis* of different origins (Lebanon and France). Variability between strains was expressed at both levels, genetic and kinetic. Heterogeneous bioreaction profiles were identified according to strain's nature. The mass balance analysis revealed the possible existence of adsorption phenomena on the cell walls of *Brettanomyces* which are strain-dependent. The last part was devoted to the evaluation of the relationship between biomass concentration and production of 4-ethylphenol as well as the influence of some environmental parameters (pH, ammonium source and culture medium) on the reaction's kinetic.

Keywords: lebanese wine, *Brettanomyces bruxellensis*, PCR, sequencing, *p*-coumaric acid, 4-vinylphenol, 4-ethylphenol, adsorption, kinetics.

Réalisé dans le cadre d'une cotutelle entre la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth et le Laboratoire de Génie Chimique de l'Université de Toulouse, ce travail est le fruit de la collaboration de plusieurs interlocuteurs que je tiens à remercier.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à M. Toufic RIZK, doyen de la faculté des Sciences, pour ses encouragements et pour la confiance qu'il m'a accordée afin de réaliser ce projet.

Je remercie également Mme Claire ALBASI, responsable du département BioSym de m'avoir accueillie au sein du LGC.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à M. Roger L'ŒIF, mon tuteur et ensuite mon directeur de thèse qui m'a accompagné et qui a su m'orienter vers le bon chemin tout au long de ma formation à la faculté des Sciences il y a déjà 9 ans ! Un support moral et scientifique a fait de M. L'ŒIF le moteur de mon travail le long de ces années. Je n'oublierai surtout pas son enthousiasme, ses conseils prodigieux qui m'ont permis de progresser et son soutien constant surtout pendant les plus dures périodes.

Je remercie également mon directeur de thèse M. Cédric BRANDAM pour avoir dirigé ce travail avec rigueur. Je salue sa gentillesse, sa disponibilité et ses efforts malgré les distances, ses encouragements et ses qualités scientifiques exceptionnelles qu'il a su mettre au service de mes apprentissages tout au long de cette collaboration.

C'était un véritable plaisir de travailler avec une personne comme toi !

J'adresse mes vifs remerciements à M. Pierre STREHAIANO pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail dès le premier jour. Son œil critique et avisé m'a surveillé de loin afin d'élaborer un travail fructifiant et enrichissant.

Tu resteras pour toujours mon meilleur modèle de motivation !

Ma reconnaissance s'adresse également à M. Dominique SALAMEH, mon codirecteur de thèse, pour les conseils que j'ai eu l'honneur de recevoir de sa part sur les plans humain et scientifique, pour son aide et pour ses suggestions et propositions afin que ce travail soit réussi.

Durant ces années, j'ai eu la chance de côtoyer au sein de la Faculté des Sciences Mme Mireille KALLASSY AWAD que je souhaite remercier pour son aide et sa bonté unique en son genre. Avec Mireille j'ai appris ce que c'était la biologie moléculaire, un domaine qui me paraissait assez étrange mais qui m'est devenu si facile grâce à l'opportunité qu'elle m'a accordée de travailler au sein de son équipe. Je te remercie surtout pour ce côté humain et pour cette amitié que tu réserves à tous ceux qui en ont besoin.

Je suis extrêmement sensible à l'honneur que m'ont fait Mme Aline LONVAUD, Professeur à l'Université de Bordeaux et M. Rachad SALIBA, Professeur à l'Université Libanaise en acceptant d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie également M. Yvan JOBARD d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Mme Patricia TAILLANDIER, pour sa gentillesse et ses précieux conseils tout au long de mon séjour à Toulouse.

Dans le cadre de mes travaux, une partie des analyses chimiques a été faite au Laboratoire des pesticides et des polluants organiques (LAPPO) du CNRS-libanais. J'adresse mes sincères remerciements au directeur du laboratoire M. Farouk JABER de m'avoir accordé la chance de travailler dans ce laboratoire. Merci aussi à M. Moḥammad EL-ISKANDARANI.

Merci également à Samia MOKH et Khaled HAWARI pour leur coopération lors de la réalisation de mes analyses, leurs conseils et leur amitié.

Ce travail n'aurait pas pu se concrétiser sans la collaboration des œnologues et producteurs de vin libanais qui ont accepté de me fournir les échantillons nécessaires à cette étude et qui m'ont accueilli dans leurs caves. Pour des raisons de confidentialité, je ne peux les nommer mais tiens à leur exprimer ma gratitude.

Mais, je nomme toutefois M. Joe-Assaad TOUMA, œnologue et propriétaire du Château Saint-Thomas à qui j'adresse tous mes remerciements pour son amitié, sa grande générosité et la qualité des vins qu'il produit. Ces vins qui font du Liban un pays reconnu au niveau international grâce aux multiples médailles qu'ils remportent chaque année.

Joe ! Je te souhaite le meilleur !

Je voudrais remercier tous le corps enseignant, les responsables et les personnels de la Faculté des Sciences qui m'a hébergé pendant 9 ans ! Un merci spécial à M. Eddy SEIF qui répond rapidement à toutes mes demandes en informatique. Merci à Hilda et Helga, responsables des laboratoires de chimie, pour votre présence et pour toutes vos aides.

Merci aussi à tous les doctorants dont je nomme Rana, Nour et Farah A.S., Jad, Krystel, Farah A., Nada, Joanna, Dayana... avec qui j'ai partagé d'agréables moments dans notre fameuse « salle des doctorants ».

Je remercie Mandy de m'avoir aidée à me familiariser avec le matériel de « biomol » et pour le temps passé ensemble en attendant la migration des gels.

Je te souhaite beaucoup de courage pour ta thèse !

Je tiens à remercier individuellement tous les membres de l'équipe BioSym pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé dès mon arrivée. Merci aussi à tous les collègues et amis du laboratoire (anciens et actuels) surtout Nathalie, Amandine, Jean-Baptiste, Luis, Marjorie, Laurence, Claudia, Jordan, Etienne, Raphaël, Omar, Noura, Julien, Diana, Caroline ... et aux libanais Samar, Sarah et Youssef pour les moments passés ensemble.

Je vous exprime toute ma sympathie et je vous souhaite tout le succès dans vos recherches !

Je remercie le conseil de la recherche de l'USJ d'avoir financé mes séjours en France.

Je remercie également l'association Philippe JABER qui m'a donné la chance de bénéficier d'un complément de bourse. Merci à Mme Joumana ABOU HAIDAR qui a pris en charge mon dossier.

Mme la Présidente MOUAWAD ! Je ne retrouve pas les mots pour vous exprimer ma reconnaissance. Je suis profondément honorée d'avoir fait votre connaissance et d'avoir partagé avec vous plusieurs discussions ! Je n'oublierai jamais vos nombreux encouragements, votre énorme soutien et surtout votre confiance.

Un grand merci à Viviane FEGHALI pour son humour exceptionnel, sa disponibilité et ses réponses à mes nombreuses demandes avec plaisir.

Ce travail n'aurait jamais été possible sans le soutien irremplaçable et inconditionnel de mes parents et de mes deux sœurs qui ont toujours été là pour moi. Ces quelques mots ne suffiront pas à vous exprimer tous mes remerciements pour m'avoir toujours donné la force de surmonter les dures épreuves et les découragements, pour m'avoir supporté quand j'étais de mauvaise humeur et pour votre appui qui m'ont permis de réussir ce long chemin !

Je vous dédie cette thèse en témoignage de mon amour infini !

A Marcel et Layla
A Joanne et Judy

Table des matières

Nomenclature	i
Liste des Figures	iii
Liste des Tableaux	xi
Introduction générale	1
Chapitre I. Aperçu bibliographique	6
I.1. Les principales caractéristiques de <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	7
I.1.1. Historique et origine	7
I.1.2. Taxonomie et diversité des souches	7
I.1.3. Morphologie	8
I.1.4. L'état « viable non-cultivable » VBNC	9
I.2. Présence et propagation de <i>Brettanomyces</i> dans le vin	10
I.3. Détection des levures <i>Brettanomyces</i>	11
I.3.1. Mise en culture sur milieu nutritif gélosé	11
I.3.2. Les méthodes de biologie moléculaire	12
I.3.3. La cytométrie de flux	13
I.3.4. Les méthodes de détection indirecte	15
I.3.4.1. Les tests rapides commercialisés	15
I.3.4.2. Les méthodes d'analyses	15
I.4. Identification génétique des <i>Brettanomyces</i> isolées du vin/Biodiversité	16
I.5. Bioconversion des acides hydroxycinnamiques par <i>Brettanomyces</i>	18
I.5.1. Les esters hydroxycinnamoyltartriques	19
I.5.2. Les différentes formes de l'acide <i>p</i> -coumarique dans le vin	20
I.5.3. Réactions enzymatiques de production des phénols volatils	21
I.5.4. Différentes étapes de la bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique en 4-éthylphénol chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	23
I.5.5. Différences de rendement et de taux de conversion	24
I.5.6. Caractéristiques des enzymes hydroxycinnamate décarboxylase et vinylphénol réductase	25
I.6. Présence de ces réactions enzymatiques chez d'autres microorganismes	27
I.7. Autres molécules odorantes et autres défauts générés par <i>Brettanomyces</i>	28
I.8. Effet de quelques paramètres sur la croissance et/ou la bioconversion	29
I.8.1. Rôle des sucres	29
I.8.2. Conditions d'aérobie et d'anaérobie	30
I.8.3. L'azote	31
I.8.4. Effet du pH	32
I.8.5. Effet de la température	33
I.8.6. L'éthanol	33
I.8.7. Rôle de quelques facteurs nutritifs	34
I.9. Stabilité des réactifs et des produits de la bioconversion	34
I.9.1. Stabilité de l'acide <i>p</i> -coumarique	34
I.9.2. Stabilité des phénols volatils dans le vin	35
I.10. Dosage des réactifs et des produits de la bioconversion	37
I.10.1. Dosage de l'acide <i>p</i> -coumarique dans le contexte œnologique	37
I.10.2. Dosage des phénols volatils	37
I.10.2.1. Dosage des produits 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol par analyse chimique	37
I.10.2.1.1. Par chromatographie en phase gazeuse	37

I.10.2.1.2. Par chromatographie en phase liquide	39
I.10.2.2. Dosage des produits 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol par analyse sensorielle	40
I.10.3. Arômes et seuil de perception des phénols volatils	41
I.11. Teneurs de l'acide <i>p</i>-coumarique et des phénols volatils dans les vins rouges du monde	42
I.11.1. Facteurs affectant la quantité de l'acide <i>p</i> -coumarique dans les vins rouges	42
I.11.1.1. Le cépage	42
I.11.1.2. Les conditions climatiques, le site géographique	43
I.11.1.3. La date de récolte	44
I.11.1.4. Les pratiques agricoles	44
I.11.1.5. L'infection de la vigne	44
I.11.1.6. Les paramètres d'extraction des composés phénoliques	45
a- La température	45
b- Les enzymes d'extraction	45
c- La macération carbonique	45
I.11.2. Concentrations de l'acide <i>p</i> -coumarique dans des vins issus de différentes origines géographiques	45
I.11.3. Teneurs des 4-éthylphénols et 4-éthylguaïacols dans les vins du monde	47
I.12. Conclusions	49
Chapitre II. Matériels et méthodes	50
II.1. Dépistage des levures <i>Brettanomyces/Dekkera</i> dans les vins libanais	51
II.1.1. Collecte des échantillons	51
II.1.2. Les vins étudiés	51
II.1.3. Nature des milieux nécessaires au dépistage de <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	51
II.1.3.1. Milieux GCA et ECA	51
II.1.3.2. Milieu solide Bi-Test (MSBT)	52
II.1.4. Procédure de dépistage	53
II.1.4.1. Culture sur milieu GCA	53
II.1.4.2. Phase d'enrichissement sur milieu ECA	53
II.1.4.3. Discrimination par la morphologie	54
II.1.4.4. Discrimination par le caractère acidifiant : test sur milieu MSBT	54
II.1.4.5. Discrimination par la technique du « sniffing »	55
II.1.4.6. Schéma récapitulatif de la procédure de dépistage	55
II.2. Caractérisation génétique des souches de <i>Brettanomyces</i> isolées	56
II.2.1. Culture des souches	57
II.2.2. Extraction de l'ADN	57
II.2.3. Vérification quantitative et qualitative de l'ADN extrait par dosage spectrophotométrique	58
II.2.4. Amplification de l'ADN par PCR (réaction en chaîne par polymérase)	58
II.2.5. Purification des produits de PCR	59
II.2.6. Hydrolyse enzymatique de l'ADN purifié et analyse par RFLP	59
II.2.7. Séquençage génétique	60
II.2.7.1. Réaction de PCR précédant le séquençage automatisé de l'ADN	60
II.2.7.2. Séquençage et analyse phylogénétique	60
II.3. Déroulement des fermentations	61
II.3.1. Nature des souches et des milieux de fermentation	61
II.3.1.1. Souches de levures	61
II.3.1.2. Milieux de culture	61
a- Milieu de Conservation	62
b- Milieu Tampon Phosphate-Citrate	62

c- Milieu Tampon Phosphate-Citrate	62
II.3.2. Suivi des expériences de Fermentation	63
II.3.2.1. Ajout de l'acide <i>trans-p</i> -coumarique au milieu de fermentation	63
II.3.2.2. Prise des échantillons pour l'étude de la réaction de bioconversion	65
II.4. Protocole opératoire pour tester l'influence du nombre de <i>Brettanomyces</i> dans un vin sur la vitesse d'apparition du 4-éthylphénol	65
II.5. Techniques analytiques et méthodes de mesures directes	67
II.5.1. Analyse de la biomasse	67
a- Evaluation de la biomasse par turbidimétrie	67
b- Numération totale de la population sur cellule de THOMA	67
c- Estimation de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de méthylène	68
II.5.2. Dosage de l'acide <i>p</i> -coumarique	69
II.5.2.1. Chromatographie : système et appareillage	69
II.5.2.2. Préparation des échantillons et conditions opératoires	69
II.5.2.3. Détection et quantification	69
II.5.2.4. Droites d'étalonnage pour le dosage de l'acide <i>p</i> -coumarique dans les vins libanais	70
II.5.3. Dosage des 4-vinylphénols et 4-éthylphénols	71
II.5.3.1. Méthode choisie et conditions chromatographiques optimisées	71
II.5.3.2. Exemple de chromatogramme	72
II.5.3.3. Calcul de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ)	73
II.5.3.4. Méthode des ajouts dosés pour la mesure des concentrations de 4-éthylphénols dans les vins	73
II.5.3.5. Défécation	74
II.6. Evaluation des paramètres cinétiques des réactions	74
II.6.1. Hypothèses et notations	74
II.6.2. Détermination des paramètres de la croissance	75
II.6.3. Calcul des vitesses relatives aux substrats et produits de la réaction	75
II.6.4. Calcul des pourcentages, du taux de conversion et des rendements de production	76
Résultats et discussions	77
Chapitre III. Etat des lieux du risque « éthylphénol » dans les vins libanais	78
III.1. Introduction	79
III.2. Echantillonnage pour le dépistage et la mesure en acide <i>p</i>-coumarique et 4-éthylphénols	79
III.3. Dosage de l'acide <i>p</i>-coumarique et des 4-éthylphénols dans les vins libanais	80
III.4. Discussions	85
III.4.1. Discussion des valeurs obtenues pour l'acide <i>p</i> -coumarique	85
III.4.2. Discussion des valeurs obtenues pour le 4-éthylphénol	85
III.4.3. Discussion des résultats du dépistage de <i>Brettanomyces</i>	87
III.5. Identification génétique des souches de levures isolées à partir du vin	88
III.5.1. Amplification du gène codant la sous unité ribosomique 26S	88
III.5.2. Amplification et polymorphisme des séquences ITS	89
III.5.3. Séquençage et phylogénie	92
III.5.4. Numéros d'accèsion des séquences (GenBank)	95
III.6. Conclusions générales	95

Chapitre IV. Bioconversion de l'acide <i>p</i>-coumarique par différentes souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	97
IV.1. Introduction	98
IV.2. Disparition/Réactivité de l'acide <i>p</i>-coumarique dans le milieu d'étude	98
IV.2.1. Problématique	98
IV.2.2. Effet de la lumière du jour sur la stabilité de l'acide <i>p</i> -coumarique	98
IV.3. Profils de croissance des souches provenant d'origines géographiques différentes	100
IV.4. Comparaison des cinétiques de bioconversion de l'acide <i>p</i>-coumarique en 4-éthylphénols pour les 5 souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	102
IV.4.1. Problématique	102
IV.4.2. Profils cinétiques des fermentations	104
IV.4.3. Discussion sur le bilan matière instantané des fermentations	106
IV.4.4. Cinétiques de bioconversion	108
IV.4.5. Conclusions	110
IV.5. Bioconversion de l'isomère <i>cis-p</i>-coumarique par <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	111
IV.6. Comparaison des cinétiques de bioconversion du 4-vinylphénol comme substrat initial pour les 5 souches de <i>B. bruxellensis</i>	115
IV.6.1. Introduction	115
IV.6.2. Discussion du bilan matière	117
IV.6.3. Aspects cinétiques des courbes	118
IV.6.4. Conclusions	120
Chapitre V. Influence des paramètres du milieu du niveau de population sur la production de 4-éthylphénol	122
V.1. Influence de la concentration en ammonium et du sulfate de magnésium sur la croissance de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> et sur la production de 4-éthylphénol	123
V.1.1. Effet d'ions minéraux et du magnésium sur la croissance de <i>Brettanomyces</i>	123
V.1.1.1. Incidence de disparition de l'acide <i>p</i> -coumarique	124
V.1.1.2. Profil comparatif de bioconversion et de bilan matière	125
V.1.2. Etude de l'effet du changement de la concentration du sulfate d'ammonium sur la bioconversion dans le milieu MSV	127
V.1.2.1. Discussion des courbes et du bilan matière	129
V.1.2.2. Tableau récapitulatif des principales valeurs	130
V.1.3. Conclusions de la partie 1	130
V.2. Influence du pH et des cellules non proliférantes de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> sur la production de 4-éthylphénol	131
V.2.1. Réalisation des expériences	131
V.2.2. Récapitulatif des résultats des courbes	131
V.2.3. Relations	134
V.2.4. Conclusions de la partie 2	136
V.3. Travail préliminaire pour la mise au point d'un kit de détection des <i>Brettanomyces bruxellensis</i> dans le vin	136
V.3.1. Introduction	136
V.3.2. Problématique et objectif de l'application	137
V.3.3. Premiers résultats obtenus	138
V.3.3.1. Evolution de la population en fonction du temps	138
V.3.3.2. Dosage des 4-éthylphénols et 4-vinylphénols	140
V.3.4. Conclusion des premiers essais et perspectives pour la suite de l'étude	144

Conclusions générales et perspectives	146
Références bibliographiques	152
ANNEXE	169

Nomenclature

<i>Brett</i>	<i>Brettanomyces</i>
HcD	Hydroxycinnamate décarboxylase
VPR	Vinylphénol réductase
GCA	Gélose d'isolement au chloramphénicol et à l'actidione
ECA	Milieu liquide d'enrichissement au chloramphénicol et à l'actidione
MSBT	Milieu solide Bi Test
P	Prélevain
L	Levain
MSV	Milieu synthétique vin
rpm	Rotation par minute
HPLC	High performance liquid chromatography
DAD	Diod array detector
EG	Éthylguaiacol
EP	Éthylphénol
VBNC	Viable non cultivable
v/v	Volume/Volume
CFU	Colony forming unit
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ITS	Internal transcribed spacer
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
DO	Densité optique
TAE	tris-acétate EDTA
4-EPMH	4-éthylphénol méthylènehydroxylase
PCMH	<i>p</i> -crésol méthylhydroxylase
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxidase
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

SA	Sulfate d'ammonium
solution A	Acide citrique
solution P	Phosphate de sodium di-sodique
MYPG	Milieu à composition confidentielle
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
AD	Pourcentage d'acide <i>p</i> -coumarique disparu
D	Pourcentage de bilan matière disparu
BMf	Quantité finale de bilan matière
RG	Rendement global
R	Rendement
T	Taux de conversion

Liste des Figures

Chapitre I. Aperçu bibliographique

Figure 1. Différentes morphologies de <i>Brettanomyces</i> dans un milieu synthétique vin	8
Figure 2. Formation des éthylphénols à partir de précurseurs d'acide cinnamique	22
Figure 3. Schéma réactionnel de la bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique en 4-éthylphénol	23
Figure 4. Produits de décomposition des dérivées d'éthyle par les enzymes 4-EPMH et PCMH	36
Figure 5. Formation des phénols volatils durant la conservation du vin	42

Chapitre II. Matériels et méthodes

Figure 6. Distinction microscopique des levures isolées sur gélose GCA	54
Figure 7. Distinction sur milieu MSBT entre les levures à caractère acidifiant et les levures non productrices d'acide	55
Figure 8. Schéma récapitulatif des différentes étapes successives de la procédure de dépistage	56
Figure 9. Emplacement de l'amorce amont ITS1 et de l'amorce aval ITS4 délimitant la région ITS à amplifier par PCR pour étude phylogénétique	57
Figure 10. Schématisation de la préparation de l'inoculum en deux étapes successives précédant la fermentation	64
Figure 11. Etude de la fermentation en 3 exemplaires	64
Figure 12. Schéma représentatif de la démarche d'analyse	65
Figure 13. Démarche opératoire	66
Figure 14. Schématisation de la cellule hématimètre de THOMA	68
Figure 15. Exemples de droites d'étalonnage des vins issus des domaines E et L, respectivement	70
Figure 16. Chromatogramme du 4-vinylphénol obtenu par HPLC/DAD à 258 nm	72
Figure 17. Courbe d'étalonnage type obtenue en utilisant la méthode d'ajouts dosés	74

Résultats et discussions

Chapitre III. Etat des lieux du risque « éthylphénol » dans les vins libanais

Figure 18. (A) répartition des échantillons en fonction de la concentration en acide <i>p</i> -coumarique, (B) lien entre teneurs en acide <i>p</i> -coumarique et en 4-éthylphénol dans les vins rouges libanais	86
Figure 19. Profil électrophorétique de la région ADN _r amplifiée par PCR avec les amorces DBRUXF et DBRUXR pour les 5 souches de levures isolées du vin	89
Figure 20. Produits de PCR purifiés avant la digestion enzymatique	90
Figure 21. Fragments de restriction des différents produits de PCR obtenus avec les enzymes (A) <i>Hae III</i> , (B) <i>Hinf I</i> et (C) <i>Cfo I</i>	90
Figure 22. Alignement des différentes séquences de fragments amplifiés de la région ITS1-ITS4	93
Figure 23. Dendrogramme (issu de Clustal W) représentant les liens de parenté entre les différents isolats de cette étude	94

Chapitre IV. Bioconversion de l'acide *p*-coumarique par différentes souches de *Brettanomyces bruxellensis*

Figure 24. (A) acide <i>p</i> -coumarique stocké à la lumière du jour dans un milieu synthétique vin, (B) acide <i>p</i> -coumarique gardé à l'abri de la lumière dans un milieu synthétique vin	99
Figure 25. Evolution de la biomasse des 5 souches	101
Figure 26. Exemple de reproductibilité (triplicat) pour la souche L1	104
Figure 27. Profil cinétique de la bioconversion de l'acide <i>trans-p</i> -coumarique en 4-vinylphénol puis en 4-éthylphénol pour les 5 souches	106
Figure 28. Isomère « <i>cis</i> » de l'acide <i>p</i> -coumarique synthétisé sur demande de Chemos GmbH	111
Figure 29. Comparaison entre deux souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> vis-à-vis des isomères de l'acide <i>p</i> -coumarique	112
Figure 30. Bioconversion de l'acide <i>cis-p</i> -coumarique par les souches F1 et L1	113
Figure 31. Profil cinétique de la bioconversion du 4-vinylphénol en 4-éthylphénol pour les 5 souches de <i>B. bruxellensis</i>	117

Chapitre V. Influence des paramètres du milieu et du niveau de population sur la production de 4-éthylphénol

Figure 32. Profils de croissance de l'isolat F1 sans (NH ₄) ₂ SO ₄ (◇) (témoin), avec MgSO ₄ (□) et avec (NH ₄) ₂ HPO ₄ (Δ)	124
Figure 33. Profils de disparition de l'acide <i>p</i> -coumarique chez l'isolat F1 sans (NH ₄) ₂ SO ₄ (◇), avec MgSO ₄ (□) et avec (NH ₄) ₂ HPO ₄ (Δ)	125
Figure 34. Profil cinétique de bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique (A) en absence du (NH ₄) ₂ SO ₄ , (B) en présence de 0,5 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ et (C) en présence de 0,5 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ HPO ₄	126
Figure 35. Profil cinétique de bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique (A) en présence de 0,25 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ , (B) 1 g.L ⁻¹ , (C) 2 g.L ⁻¹ , (D) 3 g.L ⁻¹ , (E) 6 g.L ⁻¹	129
Figure 36. Relation entre la quantité d'acide <i>p</i> -coumarique détectée initialement (après ajout) et la biomasse présente initialement dans le milieu	134
Figure 37. Relation entre biomasse initiale non proliférante et quantité de 4-éthylphénol produite	135
Figure 38. Résultats obtenus après 7 jours, (A) partant de 1 levure au départ, (B) partant de 100000 levures	138
Figure 39. Nombre de cellules après 6 jours d'incubations dans le milieu MYPG pour les 4 souches testées (F1, F2, L1 et L3) suivant le taux de contamination de l'échantillon de vin (de 1 à 100000 cellules dans 20 mL)	140
Figure 40. Cinétiques d'apparition des 4-éthylphénols dans le milieu MYPG pour les 3 souches testées pour 3 contaminations initiales (0,5 ; 50 et 5000 cellules.mL ⁻¹)	143
Figure 41. Nombre de jours d'incubation dans le milieu MYPG nécessaire pour doser au minimum 1 mg.L ⁻¹ de 4-éthylphénols suivant la contamination initiale	144

Liste des Tableaux

Chapitre I. Aperçu bibliographique

Tableau 1. Performances des différentes méthodes microbiologiques de détection de <i>Brettanomyces</i>	14
Tableau 2. Les acides hydroxycinnamiques présents dans les raisins	19
Tableau 3. Phénols volatils et produits de décomposition liés au caractère « <i>Brett</i> »	36
Tableau 4. Méthodologies analytiques permettant le dosage des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols	40
Tableau 5. Teneur de l'acide <i>p</i> -coumarique et de l'acide coutarique dans des vins Pinotage 2002, 2003	43
Tableau 6. Teneur de l'acide <i>p</i> -coumarique dans des vins (Cabernet-Sauvignon) issus de différentes régions géographiques	44
Tableau 7. Teneur de l'acide <i>p</i> -coumarique dans des vins issus de différentes origines géographiques	46

Chapitre II. Matériels et méthodes

Tableau 8. Composition des milieux GCA et ECA	52
Tableau 9. Composition du milieu MSBT	53
Tableau 10. Programme d'amplification par PCR	59
Tableau 11. Description des sites de coupure des 3 enzymes de restriction choisies pour cette étude	60
Tableau 12. Composition des milieux de culture utilisés pour les expériences de fermentation avec les différentes souches de <i>Brettanomyces</i>	61
Tableau 13. Composition des milieux tampons phosphate-citrate	63

Résultats et discussions

Chapitre III. Etat des lieux du risque « éthylphénol » dans les vins libanais

Tableau 14. Résultats du dépistage <i>Brettanomyces</i> et teneurs en acide <i>p</i> -coumarique et en 4-éthylphénol des différents vins rouges libanais.	81
Tableau 15. Comparaison des tailles des fragments de restriction des isolats et des souches de référence	91
Tableau 16. Localisation des variations entre les séquences	
Tableau 17. Comparaison entre les tailles des fragments de restriction (pb) obtenus par les deux techniques	94

Chapitre IV. Bioconversion de l'acide *p*-coumarique par différentes souches de *Brettanomyces bruxellensis*

Tableau 18. Paramètres de la biomasse	101
Tableau 19. Paramètres cinétiques de la bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique pour 5 souches	109
Tableau 20. Comparaison des quantités de constituants pour les bioconversions avec les 2 isomères de l'acide <i>p</i> -coumarique	114

Tableau 21. Paramètres cinétiques de la bioconversion du 4-vinylphénol pour les 5 souches	119
--	------------

Chapitre V. Influence des paramètres du milieu et du niveau de population sur la production de 4-éthylphénol

Tableau 22. Les concentrations testées pour chaque composé	123
Tableau 23. Paramètres cinétiques de la bioconversion de l'acide <i>p</i> -coumarique par F1 pour différentes concentrations en sulfate ammonium	130
Tableau 24. Valeurs et facteurs étudiés	131
Tableau 25. Récapitulatif des valeurs relatives aux courbes présentées dans l'ANNEXE I pour la souche F1	132
Tableau 26. Récapitulatif des valeurs relatives aux courbes présentées dans l'ANNEXE I pour la souche L2	133
Tableau 27. Nombre de levures obtenu après 6 jours d'incubation du filtre dans 20 mL de milieu MYPG (concentrations en cellules.mL ⁻¹ de milieu)	139
Tableau 28. Concentrations en [mg.L ⁻¹] des 4-éthylphénols et 4-vinylphénols formés au cours des 6 jours d'incubation dans le milieu MYPG pour F1, F2 et L3 respectivement	141

Introduction générale

Durant la vinification, l'œnologue n'est pas le seul acteur ! Il interagit en effet avec de très nombreux microorganismes parmi lesquels levures et bactéries jouent un rôle clef. Certaines souches et/ou espèces présentent un intérêt œnologique tandis que d'autres peuvent engendrer de profondes et irréversibles altérations. Cette microflore œnologique apparaît très diversifiée. On trouve des espèces fermentaires telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*; des bactéries acétiques mais également des germes d'altération tels que *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* ou bien *Pediococcus*.

Parmi ces microorganismes, la levure *Brettanomyces* est un sujet qui pose de nombreux problèmes en raison de sa capacité à produire des phénols volatils (4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol). Quand ces molécules ne sont pas trop dominantes, elles laissent le vin s'exprimer avec de l'élégance et de la fraîcheur. En revanche, lorsque ces senteurs deviennent fortes, le vin se retrouve dépourvu de subtilité et de structure. Ainsi, la qualité et la typicité du vin seront fortement dépréciées par des notes animales engendrant des pertes économiques conséquentes.

En dépit de l'existence de quelques méthodes interventionnistes empêchant les défauts générés par la présence de *Brettanomyces*, une recrudescence de ces déviations organoleptiques est observée: selon « l'International Wine Challenge à Londres » (détails fournis par Sam Harrop, MO, communication personnelle faite en 2010), les levures *Brettanomyces* sont classées comme le quatrième défaut du vin depuis 2006 (environ 13% de tous les vins testés) après le défaut du goût de bouchon (29 %) qui est en tête de liste, des sulfures (28 %) et de l'oxydation (24 %). Sur plus de 10 000 vins dégustés appartenant aux 3 millésimes 2006, 2007 et 2008, le pourcentage de vins phénolés était respectivement de 10,5 - 12,8 et 15,7 % du total des vins à défaut. Autour de 6 % du total des vins étaient rejetés pour défaut (Goode et Harrop, 2008).

Les différentes études menées au cours des dernières années ont montré le caractère mondial du problème de contamination par les levures *Brettanomyces* puisqu'il a été détecté dans des caves et des vins des différentes régions viticoles du monde.

Depuis quelques années, en raison de son essor, le Liban peut être considéré comme une nouvelle région viticole mondiale.

Créé il y a cinq mille ans par les Phéniciens, le vin du Liban peut se prévaloir d'un passé prestigieux. De cette époque, il ne reste plus grand-chose, si ce n'est un temple dédié au dieu *Bacchus*, dans la vallée de la Bekaa. L'histoire moderne commence en 1857, quand les

Jésuites rapportent d'Algérie les premiers cépages. Le premier domaine a été fondé en 1868, un autre a suivi en 1923, et un troisième en 1930 (« *Commerce du Levant* », mai 2012).

Dans ce pays, le secteur œnologique a été témoin d'une évolution importante au cours des dernières années. Le nombre de producteurs de vin sur le territoire est passé de 5 en 1998 à plus d'une trentaine actuellement. Les principaux établissements vinicoles ont leurs vignes dans le sud de la vallée de la « Bekaa » qui est depuis toujours le lieu le plus propice à la viticulture au Liban et dans la région. Véritable faille entre deux montagnes, cette région présente des facteurs naturels exceptionnels, notamment le sol et le climat, très favorables à la culture de vignes de haute qualité. Protégés à l'ouest de l'humidité méditerranéenne par le Mont-Liban, et à l'est de la chaleur du désert syrien par l'Anti-Liban, les vignobles sont plantés à partir de 850 m à une latitude de 32° dans un sol alluvial sur un sous-sol argileux. Les pentes sont généralement faibles. Les hivers sont pluvieux (400 mm de pluie (au nord) à 900 mm (au sud)) suivis d'étés secs et chauds (26 à 34°C le jour / 10 à 12°C la nuit). Les conditions climatiques sont idéales. La zone est dotée de 300 jours de soleil par an et la mer méditerranée voisine agit comme régulateur thermique. La surface vinicole couvre aujourd'hui environ 3 000 hectares de vignes. Cette croissance rapide continue puisqu'entre 100 et 200 hectares de vignes se plantent encore chaque année (données en 2012). Les cépages dominants sont essentiellement ceux des vignobles français. Actuellement, une vingtaine de cépages y est exploitée, en particulier Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah mais aussi Carignan, Cinsault et Grenache. Toutefois, le Liban possède un patrimoine riche en cépages indigènes comme *Obaideh*, *Merwa* et *Bayadeh* utilisés pour la production de vins blancs. A noter que l'*Obaideh* local est l'un des cépages clés au Liban parce qu'il entre notamment dans la composition de l'*Arak*, une fameuse « anisette » qui est en réalité une eau de vie obtenue par distillation de raisin et enrichie de grains d'anis.

Concernant la production annuelle de bouteilles de vin, le nombre a augmenté de 6 millions de bouteilles en 2002 provenant de 6 millions de Kg de raisins à 8 millions de bouteilles en 2010, dont 40 % sont exportées.

L'essor pris par le secteur œnologique au Liban s'accompagne d'une démarche d'amélioration de la qualité des vins. Les travaux réalisés et présentés dans cette thèse se placent dans ce contexte avec dans un premier temps l'évaluation du risque *Brettanomyces* dans les vignobles libanais. Actuellement, il n'existe pas de données sur la présence ou l'absence de ce type de levure dans ce pays ni même sur les teneurs en acide *p*-coumarique et

en 4-éthylphénols dans les vins. Le premier objectif sera donc de faire l'état des lieux de ce phénomène dans les caves et les vins libanais.

Le second objectif concerne la compréhension et l'étude des différentes étapes du mécanisme réactionnel et les aspects cinétiques de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol.

L'influence de différents facteurs seront testés et notamment l'effet de la biodiversité avec l'utilisation de souches isolées au Liban et d'autres en France.

D'un point de vue pratique, ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un projet de recherche entre l'Université Saint-Joseph de Beyrouth (Liban) et le département BioSym du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse (France). Cette thèse en co-tutelle s'est déroulée pour moitié au Liban et pour moitié en France.

Elle fait suite à deux thèses en cotutelle qui se sont concentrées sur cette même thématique concernant les différents aspects de contamination des vins par *Brettanomyces*. Le premier travail (thèse de Medawar, 2003) a présenté l'étude physiologique de ces levures dans un contexte œnologique. Une méthode microbiologique de dépistage a été mise au point. La deuxième thèse (Salameh, 2008) qui a suivi s'est attachée à l'étude de l'apparition des 4-éthylphénols dans les vins à partir de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique par *Brettanomyces*.

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres. Le premier sera réservé à une **synthèse bibliographique** regroupant l'ensemble d'informations et de connaissances sur les principales caractéristiques de la levure *Brettanomyces* dans le vin. Les différentes méthodes de détection et d'identification génétique seront exposées avant de détailler le processus enzymatique de la réaction de bioconversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol tout en citant les multiples facteurs qui peuvent influencer le déroulement de ce processus. Ensuite, une description des méthodes utilisées pour le dosage des produits de la bioréaction est présentée suivie d'un résumé sur les teneurs de l'acide et des phénols volatils présents dans les vins du monde.

Le **deuxième chapitre** présente les matériels biologiques et chimiques et les méthodes utilisés au cours de ce travail, détaillant la procédure de dépistage, le déroulement des essais de fermentation dans un milieu synthétique vin et les équations cinétiques nécessaires pour évaluer les paramètres de chaque réaction.

La partie **résultats et discussions** comporte 3 chapitres. Le **chapitre III** est consacré à l'évaluation des teneurs de l'acide *p*-coumarique et des 4-éthylphénols dans les vins libanais sélectionnés. Il comporte aussi les résultats du dépistage de *Brettanomyces* au Liban ainsi qu'une identification génétique des isolats retenus. Le **chapitre IV** montre une étude comparative des cinétiques de bioconversion entre différents souches de *Brettanomyces bruxellensis*. Les deux réactifs utilisés seront l'acide *p*-coumarique et le 4-vinylphénol. Cette partie s'intéressera aux phénomènes d'adsorption sur les parois des levures mis en évidence par l'analyse du bilan matière. Dans le **chapitre V**, une corrélation entre la biomasse et la quantité de phénols produites sera mise en évidence ainsi que l'influence de la variation de quelques facteurs environnementaux sur la croissance et/ou la bioréaction.

Le travail sera finalement **conclu** par les principaux résultats à retenir et par les différentes **perspectives** qui en découlent afin de vérifier les hypothèses proposées.

Chapitre I

Aperçu bibliographique

I.1. Les principales caractéristiques de *Dekkera/Brettanomyces*

I.1.1. Historique et origine

Le genre *Brettanomyces* a été proposé pour la première fois à la brasserie Carlsberg en 1904 par N. Hjelte Claussen pour une levure impliquée dans une lente fermentation secondaire d'une vieille bière anglaise. Claussen a d'abord inclus sa levure dans le genre *Torula*. Le nom *Brettanomyces* n'a été utilisé qu'en 1921 par Kufferath et Van Laer comme nom générique à deux espèces de levures : *Brettanomyces bruxellensis* et *Brettanomyces lambicus*. Cette dernière, isolée à partir d'une bière lambic, montrait beaucoup de ressemblance à la souche de Claussen (Van Nedervelde et Debourg, 1995).

Le nom *Brettanomyces* a été choisi en raison de la relation étroite de cette levure avec l'industrie brassicole britannique. « *Brettano* » signifie brasseur britannique (British brewer) et « *myces* » signifie champignon (fungus). Ainsi, *Brettanomyces* signifie champignon de brassage britannique (British brewing fungus) (Licker *et al.*, 1998a).

La présence de *Brettanomyces* a été signalée dans de nombreux travaux par plusieurs auteurs mais beaucoup d'erreurs ont été commises au fil du temps quant à la vraie caractérisation de ce genre. A titre d'exemple, Lodder et Kreger-van Rij ont montré que l'isolat *Brettanomyces italicus* nommé par Verona et Florenzano était en réalité un isolat appartenant à l'espèce *Torulopsis bacillaris*. En 1933, Krumbholz et Tauschanoff ont isolé une levure à partir d'un moût de raisin français et l'ont désignée comme *Mycotorula intermedia* mais, finalement, elle appartenait à l'espèce *B. bruxellensis* (Peynaud et Domercq, 1956).

I.1.2. Taxonomie et diversité des souches

Différentes souches ont été et sont encore isolées du vin et d'équipements vinicoles du monde entier. Actuellement, la taxonomie comprend cinq espèces reconnues du genre *Brettanomyces/Dekkera* avec beaucoup de synonymes employés. *B. nanus* a été ajoutée aux quatre espèces déjà reconnues (*B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, et *B. naardenensis*) après le changement de nom *Eeniella nana* dû à l'homologie de la séquence ADNr (Egli et Henick-Kling, 2001).

Le nom *Dekkera* décrit le téléomorphe, en d'autres termes l'état parfait qui désigne la forme sporogène. Seuls deux téléomorphes existent pour les deux premières espèces *Dekkera*

bruxellensis et *Dekkera anomala* (Kurtzman et Fell, 2000 ; Cocolin *et al.*, 2004). La distinction entre *Brettanomyces* et *Dekkera* n'est pas nécessaire puisque les techniques moléculaires actuelles de détection d'ADN n'ont trouvé aucune variation entre les deux états téléomorphe et anamorphe (Oelofse *et al.*, 2008 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006).

De toutes les espèces déjà connues, seule *B. bruxellensis* est associée au domaine œnologique. Les synonymes utilisés pour cette espèce sont *D. intermedia*, *B. intermedius*, *B. lambicus*, *B. custersii* et *D. bruxellensis* (Stender *et al.*, 2001) ou encore *B. abstinens*, *B. lambica*, *B. patavinus*, *B. schanderlii* (Barbin, 2006). Aujourd'hui, tout autre nom utilisé est considéré comme issu de nomenclature ancienne et n'est plus reconnu.

I.1.3. Morphologie

La morphologie des *Brettanomyces* est très variée. Elles peuvent se présenter sous des formes sphéroïdes, ovales, cylindriques, mais aussi allongées (**Figure 1**). De plus, cette morphologie peut changer en fonction des conditions du milieu de culture (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000). Par exemple, la forme «cuillère» apparaît suite à un manque de substrat comme l'extrait de levures. Quant au stress alcoolique, il peut induire des formes ovoïdes en chaînettes ou aussi turgescentes en grappes. Le dioxyde de soufre lui, provoque une morphologie de cellules plasmolysées en étoile (Medawar, 2003).

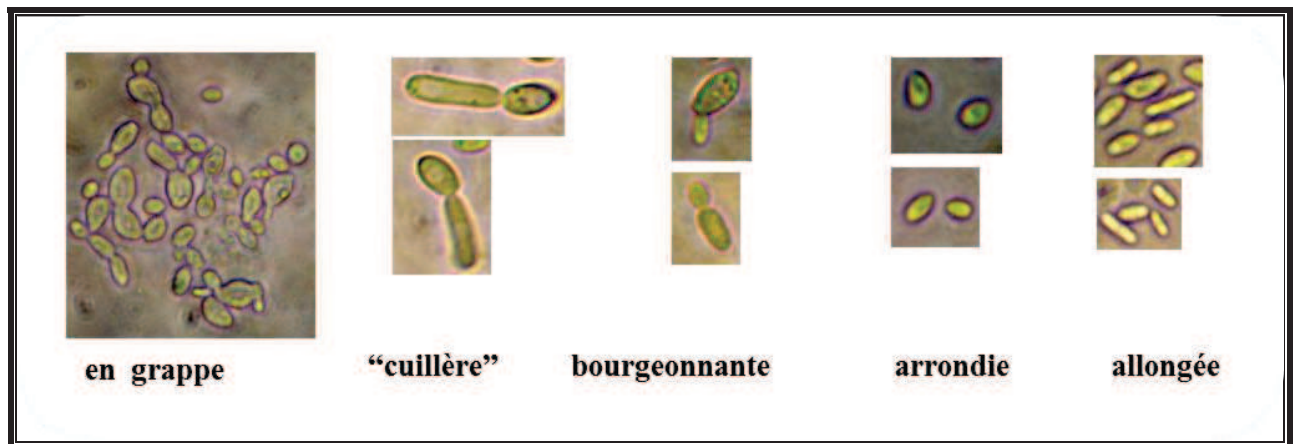


Figure 1. Différentes morphologies de *Brettanomyces* dans un milieu synthétique vin (photos prises au cours de nos travaux).

En comparant avec le genre *Saccharomyces*, les levures *Brettanomyces* paraissent plus petites mais elles sont facilement isolées et visibles au microscope optique. Elles apparaissent souvent

en paire ou formant de petites chaînes et des pseudomycéliums. Le mode de multiplication de ces cellules est le bourgeonnement multipolaire (Van der Walt, 1970). En reproduction sexuée de la forme *Dekkera*, elles forment des asques contenant 1 à 4 ascospores.

I.1.4. L'état « viable non-cultivable » VBNC

L'état VBNC peut être caractérisé comme un état où les cellules sont métaboliquement actives mais incapables de croître sur un milieu de culture (Oliver *et al.*, 1993). Cet état de dormance peut se produire pendant de longues périodes dans les vins mis en bouteille et les composés volatils peuvent être présents même lorsque les levures sont indétectables par culture. Plusieurs facteurs pourraient être liés à l'entrée en VBNC comme le stress environnemental (Oliver *et al.*, 1995), la température, l'état physiologique des levures, la carence nutritionnelle du milieu. En œnologie, le SO₂ serait également responsable de cet état. Lors du stockage du vin, les levures en VBNC peuvent passer à travers des membranes de filtration de 0,45 µm du fait du rétrécissement de leur taille (Millet et Lonvaud-Funel, 2000) ; leur taille normale étant entre 2 et 7 µm.

Les microorganismes ont la nécessité de sortir de l'état VBNC dès que les conditions environnementales le permettent puisque ce phénomène est réversible. D'un point de vue œnologique, une telle situation est problématique puisque des vins jugés microbiologiquement stables peuvent développer une contamination au cours du temps. Ainsi, les méthodes de microbiologie classique de détection de *Brettanomyces* en milieu de culture ne sont pas suffisantes pour s'assurer de l'absence de risque d'altération dû à ces levures. Les techniques basées sur l'amplification d'ADN spécifique de *Brettanomyces* ne font pas non plus la distinction entre les différents états physiologiques de la cellule (vivante, morte ou VBNC).

Actuellement, aucune technique ne permet l'identification ou la limitation de cet état dans le vin. Des travaux récents de Laforgue et Lonvaud-Funel (2012) suggèrent que les cellules non cultivables conservent une certaine activité enzymatique de l'hydroxycinnamate décarboxylase. Cette activité a été déterminée à la fois dans des extraits acellulaires et chez des cellules au repos après divers traitements de SO₂ dans des milieux synthétiques. Après sulfitage faible (environ 50 mg.L⁻¹ de SO₂ total), les levures ont perdu une partie de leur activité enzymatique, mais pas leur cultivabilité. Alors qu'à des doses plus élevées (au moins 75 mg.L⁻¹ de SO₂ total), la majorité des levures avaient perdu leur cultivabilité mais ont toujours conservé une partie de leur activité enzymatique.

I.2. Présence et propagation de *Brettanomyces* dans le vin

Dans la littérature, les espèces de *Brettanomyces* sont associées à divers produits fermentés comme le vin, le cidre, la bière, la kombucha et le kéfir (Thurston et Tubb, 1981 ; Licker *et al.*, 1998a ; Avrick et Henick-Kling (2002) ; Suárez *et al.*, 2007). Selon Avrick et Henick-Kling (2002), les *Brettanomyces* spp. sont omniprésentes et ont été isolées dans de nombreuses régions dumonde. La présence de *Brettanomyces* sp. a été notamment signalée dans les vins de différentes régions viticoles, dont l'Allemagne, la France, l'Afrique du Sud, l'Italie, le Brésil, l'Ouzbequistan, l'Espagne, le Portugal, la Nouvelle-Zélande, la Grande-Bretagne et les Etats-Unis. De même, une étude approfondie et récente réalisée par Curtin *et al.* (2007), a montré que des levures *D. bruxellensis* ont été isolées de vins issus de toutes les régions viticoles australiennes.

Au niveau des connaissances actuelles, l'origine de la contamination des vins par *Brettanomyces* n'est pas encore très claire. Renouf et Lonvaud-Funel (2007) ont isolé des *Brettanomyces* sur la surface des baies de raisin suggérant que ces derniers représentent la source principale de contamination et qu'un contrôle efficace devra commencer au vignoble. Des *Brettanomyces* ont été isolées aussi sur tout l'équipement vinicole, que ce soit des cuves, des pompes ou tout matériel difficile à nettoyer ou à stériliser. De façon générale, l'hygiène reste l'élément critique qui peut aggraver le risque de l'altération.

Les mouches des fruits (*Drosophila melanogaster*) ainsi que les abeilles peuvent faciliter la propagation des levures au sein des établissements viticoles. Ces levures peuvent se fixer sur le corps, les pattes et les ailes des insectes et peuvent donc se propager sans contact direct avec les zones déjà contaminées (Licker *et al.*, 1998a ; Martorell *et al.*, 2006).

Ces levures se retrouvent surtout dans les vins rouges et moins fréquemment dans les vins blancs (Dias *et al.*, 2003a) où le dioxyde de soufre (SO₂) est plus largement efficace aux basses valeurs du pH (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006).

Brettanomyces peut croître au cours du vieillissement du vin rouge en barriques, en particulier lorsque la concentration de SO₂ est faible (SO₂ moléculaire < 0,5 mg.L⁻¹), le pH élevé (> 3,8) et la température supérieure à 15°C (Benito *et al.*, 2009a) et même parfois après l'embouteillage.

Aujourd'hui, les nouvelles techniques de vinification au sein de propriétés "bio" favorisent davantage la présence de *Brettanomyces*. L'abandon du soufre, en serait une des causes principales.

I.3. Détection des levures *Brettanomyces*

En vinification, il est important de pouvoir dépister les levures *Brettanomyces* avant qu'elles ne produisent des métabolites indésirables.

Aucune méthode actuelle autorisée n'est totalement efficace pour éliminer les phénols volatils produits par *Brettanomyces*. La prévention, par le biais de l'analyse, reste le seul outil du vinificateur. Deux méthodes peuvent être envisagées : la numération directe de *Brettanomyces* et/ou une méthode indirecte via la quantification des phénols volatils supposés produits spécifiquement par cette levure. Les méthodes doivent être capables de fournir des résultats rapides, avec une spécificité élevée et une grande sensibilité afin d'agir pour préserver le vin.

I.3.1. Mise en culture sur milieu nutritif gélosé

La détection microbienne est encore exécutée régulièrement par le dénombrement de colonies par culture sur milieu gélosé. Elle demeure pour l'instant la méthode la plus utilisée malgré toutes les autres nouvelles techniques qui sont apparues ces dernières années. Cette technique reste partiellement spécifique même si la majorité des milieux de culture utilisés pour la détection contiennent du cycloheximide (actidione). Ce produit est un antifongique qui permet l'inhibition de la plupart des levures *Saccharomyces*. Cependant, d'autres levures non-*Saccharomyces* et notamment les levures indésirables du genre *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia guilliermondi*, *Schizosaccharomyces pombe* ou *Candida parapsilosis* peuvent résister au cycloheximide à des concentrations allant de 10 à 100 mg.L⁻¹, phénomène connu pour *D. anomala* et *D. bruxellensis* (Benito *et al.*, 2006).

Les milieux d'isolement peuvent être constitués de plusieurs composés, chacun ayant une fonction pouvant servir au développement de *Brettanomyces* et/ou de son odeur. En effet, la levure *Brettanomyces* est connue pour sa grande tolérance à l'éthanol par rapport au genre *Saccharomyces* (Renouf *et al.*, 2006, Silva *et al.*, 2004), d'où l'utilisation de cet agent antimicrobien (Rodrigues *et al.*, 2001) à côté du cycloheximide dans les milieux d'isolement.

L'éthanol a alors pour rôle d'inhiber le développement de *S. cerevisiae*, des bactéries et d'autres levures indigènes qui peuvent interférer.

Lorsqu'il s'agit d'une détection olfactive, l'acide *p*-coumarique peut être ajouté au milieu d'isolement en tant que précurseur de la production des 4-éthylphénols. Il est ajouté sous filtration stérile en raison de sa décomposition à haute température (Sigma-Aldrich, 2007). Dans ce cas, le sucre peut être aussi utilisé pour diminuer les niveaux d'acide acétique qui peuvent interférer avec la détection olfactive des 4-éthylphénols par les dégustateurs formés (Couto *et al.*, 2005). Dans leur milieu d'isolement, Rodrigues *et al.* (2001) ont utilisé le vert de bromocrésol pour différencier les souches productrices d'acide, en d'autres termes les *Brettanomyces*.

La méthode d'isolement reste peu onéreuse mais elle présente plusieurs inconvénients tels les longs délais de réponse (1 semaine minimum) et la détection globale de toutes les souches résistantes y compris celles qui ne produisent pas de phénols. De même, ces analyses microbiologiques classiques ne permettent pas la détection de la population viable mais non cultivable (VBNC) entraînant notamment des faux négatifs surtout après les premiers jours qui suivent un sulfitage. Cependant, il est conseillé de faire une première lecture sur boîte à 3 jours (pour les colonies non-*Brettanomyces*) suivie d'une deuxième lecture tardive à 7-8 jours (pour les colonies *Brettanomyces*) (Gerland, 2010). C'est pourquoi un vin jugé exempt de *Brettanomyces* à l'analyse lors du conditionnement peut présenter des altérations en bouteille dues à la population (VBNC).

I.3.2. Les méthodes de biologie moléculaire

La PCR est une technique de biologie moléculaire qui consiste à synthétiser en grande quantité une séquence d'ADN de telle manière qu'il devient alors possible de la détecter quel que soit l'état physiologique du microorganisme. La PCR multiplie les brins d'ADN au cours de cycles successifs et permet ainsi la détection des populations de *Brettanomyces* y compris en état de dormance. Face à la méthode microbiologique traditionnelle, et aux méthodes non spécifiques, la biologie moléculaire (PCR) apporte des solutions de détection de hauts niveaux de rapidité (réponse entre 24 à 48 heures), de sensibilité (1 à 5 germes.mL⁻¹), et de spécificité. Mais elle reste relativement chère et nécessite un personnel qualifié pour les opérations d'extraction, et de fragmentation (Gerland, 2010). Aussi, comme inconvénients, cette technique ne fournit aucune

information sur le niveau de contamination (Delaherche *et al.*, 2004) et peut souvent générer des faux positifs car la réaction amplifie indifféremment l'ADN des cellules vivantes et/ou mortes.

Dans certains cas, les polyphénols ou tanins du moût ou du vin peuvent être des inhibiteurs de la PCR en causant des difficultés dans la détection des organismes présents en faible quantité dans le milieu (Loureiro et Malfeito-Ferreira 2006). Il est donc nécessaire d'éliminer ces composés inhibiteurs lorsque la réaction de PCR est mise en œuvre directement sur un échantillon de moût ou de vin.

La PCR seule ne suffit pas pour connaître les fonctions ou les relations entre les différentes espèces. Elle est souvent couplée à d'autres méthodes de biologie moléculaire afin d'évaluer la biodiversité des souches. Ces méthodes seront développées dans le paragraphe I.4.

I.3.3. La cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique assez récente qui a été proposée pour une quantification de *Brettanomyces* directement en vin (Gerbaux, 2007). La technique consiste à déterminer l'activité estérase des levures viables. Expérimentalement, les cellules sont marquées en fluorescence avec la fluorescéine diacétate, fluorochrome permettant de marquer tous les microorganismes vivants présents dans le vin. La fermentation alcoolique doit être bien terminée dans le vin à analyser afin de limiter des interférences dues à la présence de cellules vivantes de *S. cerevisiae* qui perturbent la détermination des *Brettanomyces*. Le seuil minimum arbitrairement fixé pour donner un dénombrement chiffré est de 200 cellules de *Brettanomyces* par ml dans le vin. Pour les vins les mieux clarifiés, il est possible de quantifier en dessous de 200 cell.mL⁻¹. Au contraire, cette limite devient imprécise pour les vins les plus chargés en particules diverses. Concernant la limite supérieure, il est possible de déterminer des niveaux de population jusqu'à environ 1 million de cell.mL⁻¹ sans dilution préalable. Cette technique a l'avantage d'être très rapide (10 min d'incubation et 3 min de mesure) et permet donc de suivre le développement de *Brettanomyces* dans les chais et de donner un degré d'urgence pour une opération de stabilisation. Elle ne permet cependant pas une quantification efficace de *Brettanomyces* et l'équipement nécessaire est cher (Gerbaux, 2007 ; Gerbaux et Berger, 2009). En comparant avec l'analyse sur boîte de pétri, la cytométrie de flux peut dans quelques cas surestimer le risque *Brettanomyces* (8 % des cas analysés en prenant en compte les levures en état VBNC) mais jamais le sous-estimer.

La cytométrie de flux couplée à l'identification par PCR est une méthode qui est apparue récemment (en 2010) mais est toujours sous test pour être validée et lancée prochainement. En effet, il s'agit de 2 analyses, la première permet de dénombrer les levures vivantes présentes dans l'échantillon de vin et la deuxième permet de détecter si ces levures sont bien des *Brettanomyces*. Cette analyse se déroule en 4 étapes et dure environ 5 heures : l'extraction de l'ADN, l'amplification de l'ADN, la liaison de cet ADN à des billes fluorescentes et la lecture du résultat sur le CyFlow Oenolyser. Cette méthode présente l'avantage d'éviter le problème des faux positifs (c'est à dire l'identification d'ADN de levures mortes) puisque le test n'est réalisé que si des levures viables ont été détectées par cytométrie préalablement. Elle peut être aussi intéressante pour les laboratoires équipés de PCR quantitative, afin de leur permettre de faire un premier tri des vins et de ne faire la PCR quantitative que sur les vins contenant des levures viables (Gerland, 2010).

En conclusion sur cette partie concernant les méthodes directes de détection, le **Tableau 1**, proposé par Gerland en 2010, résume les caractéristiques de quelques méthodes proposées pour l'identification des *Brettanomyces* dans le vin.

Tableau 1. Performances des différentes méthodes microbiologiques de détection de *Brettanomyces* (Gerland, 2010).

Technique	Spécificité	Sensibilité	Rapidité	Coût par analyse (€) *
milieu de culture solide	+	++	7 jours	20 - 25
milieu de culture liquide (Sniff'Brett)	++	++	1 à 10 jours	15 - 20
PCR quantitative	+++	+++	8 heures	85 - 125
cytométrie simple	+	+	15 minutes	20 - 25
cytométrie couplée PCR	+++	++	8 heures	40 - 50

Légendes : +++ très bon, ++ bon, + moyen, - mauvais ; * prix proposés par les laboratoires en France

Rappel: La sensibilité d'un test est sa capacité à donner un résultat positif lorsque la contamination est présente. Elle s'oppose à la spécificité, qui est la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque la contamination n'est pas présente.

I.3.4. Les méthodes de détection indirecte

I.3.4.1. Les tests rapides commercialisés

Il s'agit de kits de détection qui se présentent sous forme de tests immuno-enzymatiques et qui permettent l'identification et la quantification spécifique d'un microorganisme. Le kit se présente en général sous forme d'une microplaque recouverte prête à l'emploi. Les puits de la microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché ; cet antigène doit être spécifique de la présence de *Brettanomyces*. Lors de cette opération, appelée « coating », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interactions électrostatiques. Pour certains kits, les réponses (croissance ou absence de microorganismes) aux réactifs présents sont comparées avec une base de données, permettant d'identifier l'espèce. Ce kit de détection permet aux producteurs de vin de réaliser les analyses de détection de *Brettanomyces* par eux-mêmes, ce qui, outre la fiabilité et la rapidité d'analyse, présente un grand intérêt en termes de mise en œuvre. Cependant, le coût du kit reste assez élevé en comparaison avec la culture traditionnelle sur milieu gélosé.

De nombreuses exemples sont commercialisées : le *Sniff brett*, le *Z-Brett 24*, etc. Le premier kit est un milieu de culture liquide qui permet d'estimer le niveau de contamination sans nécessité d'expertise microbiologique très développée. La contamination est vérifiée par détection d'une odeur putride. Un avantage de ce test est qu'il permet de détecter les *Brettanomyces* qui se trouvent à l'intérieur du bois et de contrôler l'efficacité du processus de nettoyage des fûts.

I.3.4.2. Les méthodes d'analyses

Les méthodes indirectes reposent aussi sur l'analyse chimique et sensorielle à l'aide de dégustateurs entraînés (« sniffing ») ou sur l'analyse des métabolites formés notamment le dosage des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols.

Toutefois, concernant ces méthodes, une étude génétique et physiologique de *B. bruxellensis* a montré que 80 % des souches sont productrices de 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol et que seules 50 % étaient capables de produire des niveaux élevés de ces composés. Cette étude montre que les tests utilisés pour mettre en évidence la présence de *Brettanomyces* à partir de l'identification de ces composés peuvent ne pas être toujours précis (Conterno *et al.*, 2006).

Ces méthodes seront développées dans le paragraphe **I.10.2**.

I.4. Identification génétique des *Brettanomyces* isolées du vin/Biodiversité

Les techniques d'identification et de caractérisation génétique sont extrêmement fiables quand elles mettent en évidence des différences. Par contre, une identité de profil génétique ne permet pas de conclure à une identité parfaite entre deux souches **mais uniquement à une très forte probabilité** que ces souches soient réellement les mêmes. Chaque analyse supplémentaire, effectuée au moyen d'une des méthodes disponibles et livrant encore une fois des profils identiques ne fera qu'augmenter cette probabilité. **On peut donc toujours conclure à une différence entre souches, jamais à une identité parfaite.** Par ailleurs, quelle que soit la technique utilisée, identité de profil génétique n'est pas nécessairement synonyme d'identité de comportement fermentaire. (IFV, Outils en ligne, Fiches levures, Identification de microorganismes).

Lorsque les caractéristiques morphologiques ou phénotypiques sont insuffisantes pour identifier une espèce de levure ou souvent difficiles à interpréter car il s'agit de variations continues où de nombreux gènes peuvent être impliqués, les méthodes moléculaires sont utilisées. Elles sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Les méthodes moléculaires sont basées sur l'étude d'un gène, d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total, en fonction du but poursuivi (Verscheure *et al.*, 2002). Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer la diversité génétique levurienne aux niveaux intra- et inter-populations au sein de l'écosystème œnologique.

Compte tenu de l'évolution récente des méthodes de biologie moléculaire pour l'étude de *B. bruxellensis*, cette partie sera organisée d'une façon chronologique en fonction de l'apparition des différentes techniques utilisées.

En 1996, des chercheurs avaient décrit la caractérisation génétique des souches de *B. bruxellensis* par analyse du contenu d'ADN par cellule, par analyse électrophorétique du caryotype et par analyse des profils de restriction d'ADN mitochondriaux. Ensuite, une PCR qui permet l'amplification spécifique de l'ADN des souches de *B. bruxellensis* a été mise au point (Ibeas *et al.*, 1996). En 1999, la RAPD-PCR (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) a été utilisée pour la discrimination entre les différentes espèces du genre *Brettanomyces* d'une part et

la discrimination entre souches d'une même espèce de *B. bruxellensis* (Mittrakul *et al.*, 1999) d'autre part. De même, la PCR-RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) s'est révélée utile pour la discrimination inter-espèces (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). La technique consiste à amplifier une région spécifique de taille variable dans le génome suivie d'une digestion par plusieurs enzymes de restriction bien choisies. Le résultat sera plusieurs fragments d'ADN de tailles variables selon les espèces. Les séquences 26S de l'ADNr (D1/D2) ou encore ITS sont utilisées dans différentes études pour l'identification des espèces de *Brettanomyces/Dekkera* par cette technique décrite dans la littérature (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Nisiotou et Gibson, 2005).

Deux ans plus tard, quatre amorces spécifiques ont été désignées pour une discrimination spécifique au sein de l'espèce (Egli et Henick-Kling, 2001). Ces séquences spécifiques couvrent la région 5.8S de l'ARN ribosomal et les espaceurs internes transcrit (internal transcribed spacer, ITS1 et ITS2) et peuvent être ciblées pour l'identification des espèces de *Brettanomyces/Dekkera* (Egli et Henick-Kling, 2001) par PCR. Ces régions sont utilisées dans de nombreuses études pour l'identification des levures (White *et al.*, 1990; Guillamón *et al.*, 1998).

Ces techniques, surtout la PCR RFLP, sont le plus souvent couplées au séquençage génétique de la région de base amplifiée, par exemple D1/D2 ou ITS1/ITS4.

En 2001, une technique autre que la PCR a été mise en place. Cette technique connue sous le nom d'hybridation fluorescente in situ utilise des sondes d'acides nucléiques peptidiques (PNA) a aussi servi à l'identification de *B. bruxellensis*. Cette méthode est très efficace puisqu'elle possède une sensibilité et une spécificité de 100 % (Stender *et al.*, 2001). Ce test utilise des sondes de PNA marquées à la fluorescéine pour cibler une séquence spécifique de l'ARN appartenant à l'espèce *B. bruxellensis*.

En 2004, des chercheurs ont mis au point une méthode PCR qui a permis de différencier les espèces *B. bruxellensis* des *B. anomalus*. Ensuite la technique a évolué vers une PCR en temps réel qui quantifie la présence de *B. bruxellensis* dans le vin et qui présente des limites de détection de l'ordre de 10^4 CFU.mL⁻¹ (Delaherche *et al.*, 2004). Dans cette même année, une comparaison entre différents isolats indigènes issus du vin a été réalisée en utilisant trois méthodes différentes : l'analyse électrophorétique du caryotype, la PCR-RFLP et la RADP-PCR. L'analyse du caryotype a permis de voir les variations significatives entre les modèles

chromosomiques des différentes souches mais elle n'a pas permis le regroupement des isolats en espèces (Henick-Kling *et al.*, 2004).

Le premier séquençage partiel du génome de *Brettanomyces* a été réalisé par des Irlandais en 2006 (Woolfit *et al.*, 2007). Ce séquençage de l'ADN est la lecture de la succession des nucléotides (A, T, C, G) composant un brin d'ADN. Cette technique est devenue un outil utile et important pour la classification des espèces.

L'analyse AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a été utilisée pour la caractérisation des souches de *D. bruxellensis* isolées des établissements vinicoles australiens (Curtin *et al.*, 2007). Ainsi, la technique a permis l'identification de 8 génotypes provenant d'un total de 244 isolats originaires de 31 régions viticoles. Cette technique, décrite pour la première fois par Vos *et al.* (1995), est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification par PCR.

En 2009, de nouveaux protocoles sont apparus avec différentes compositions pour le mélange utilisé pour l'analyse par PCR (Tessonniere *et al.*, 2009).

Récemment (fin 2011), les chercheurs de l'Australian Wine Research Institute viennent de séquencer le génome complet de *Brettanomyces*. L'analyse du contenu génique a révélé un enrichissement en protéines membranaires, en particulier les transporteurs, ainsi que des enzymes oxydoréductase. Cette étude est une ressource plus approfondie de l'organisation génomique de cette espèce et de la caractérisation fonctionnelle des gènes qui confèrent d'importants traits phénotypiques (Curtin *et al.*, 2012).

I.5. Bioconversion des acides hydroxycinnamiques par *Brettanomyces*

Les composés phénoliques du vin sont généralement divisés en deux groupes distincts en fonction de leur squelette carboné (Jin *et al.*, 2009, Castillo-Sánchez *et al.*, 2008) :

- **les flavonoïdes** qui regroupent les anthocyanes, les monomères et polymères du flavan-3-ol, les flavonols et les dihydroflavonols. La structure chimique des composés flavonoïdes est basée sur 15 atomes de carbone dont deux cycles benzéniques adhésés

l'un à l'autre par une chaîne linéaire à trois carbones (C6-C3-C6). On parle de la structure 2-phényl-benzopyrone.

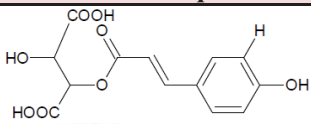
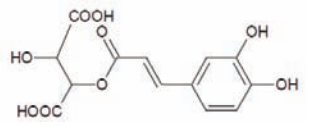
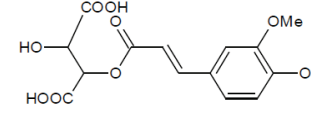
- **les non-flavonoïdes**, quant à eux, présentent un cycle aromatique primaire attaché à un ou trois autres atomes de carbone. Ces derniers regroupent les esters hydroxycinnamoyltartriques (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques) et les stilbènes.

Basha *et al.* (2004) ont parlé d'un troisième groupe qu'ils ont nommé complexe phénols-protéines-polysaccharides.

I.5.1. Les esters hydroxycinnamoyltartriques

Historiquement, les esters hydroxycinnamoyltartriques que l'on retrouve initialement présents dans le raisin (Ribéreau-Gayon, 1965), ont été improprement appelés acides phénols ou acides hydroxycinnamiques. Trois esters ont été identifiés à ce jour: l'acide caféoyltartrique, l'acide *p*-coumaroyltartrique et l'acide féruloyltartrique (**Tableau 2**).

Tableau 2. Les acides hydroxycinnamiques présents dans les raisins (Roland, 2010).

Noms	Noms simplifiés	Concentrations dans les moûts (mg.L ⁻¹)	Formules chimiques
Acide caféoyltartrique	Acide <i>trans</i>-caftarique	20 - 400	
Acide <i>p</i> -coumaroyltartrique	Acide <i>trans</i>-coutarique	0 - 20	
Acide féruloyltartrique	Acide <i>trans</i>-fertarique	Très faible quantité	

Les esters hydroxycinnamoyltartriques sont naturellement présents sous leur forme E qui est généralement plus stable et donc plus fréquente (Rentzsh *et al.*, 2009). Cependant, une isomérisation peut se produire en présence de lumière (Ong et Nagel, 1978). Les isomères Z, longtemps confondus avec les dérivés glucosylés, existent en faibles quantités dans le raisin (Singleton *et al.*, 1978). Seul l'adduit glucosylé de l'acide *trans*-coutarique a été identifié provenant du cépage *Vitis vinifera* (Somers *et al.*, 1987).

Les acides hydroxycinnamiques (HCA) sont libérés dans le jus de raisin au cours du processus de macération. Au moment où la fermentation commence, la concentration en éthanol augmente progressivement ce qui induit l'extraction de tous les composés phénoliques. Dans le vin, les acides hydroxycinnamiques sont présents en faibles quantités sous leur forme libre, tandis que les formes d'esters de l'acide L-(+)-tartrique, sont prédominants. Les acides chlorogénique, quinique ainsi que les esters des acides hydroxycinnamiques ne sont pas présents dans le vin, mais on trouve les esters de l'acide tartrique (Singleton *et al.*, 1978).

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caftarique prédomine (jusqu'à 50 % du total de ces acides). Dans le vin, les niveaux de concentration de ces acides dépendent de nombreux facteurs comme le cépage, les conditions de croissance, le climat, etc. Il n'est donc pas surprenant de trouver des différences dans les concentrations pour différents types de vins.

En général, des concentrations d'acides hydroxycinnamiques de l'ordre de 100 mg.L⁻¹ sont décrites. Pour les acides *p*-coumarique et fertarique, les valeurs sont d'environ 55 mg.L⁻¹ et 16 mg.L⁻¹, respectivement. Alors que dans les jus de raisin et les vins jeunes, le contenu en acides hydroxycinnamiques est très faible, une augmentation peut être observée au cours du stockage. Les esters sont hydrolysés et donnent lieu à des formes libres des acides hydroxycinnamiques (Rentzsh *et al.*, 2009).

Dans les cellules végétales, les acides phénoliques peuvent jouer le rôle de toxine naturelle contre la croissance de microorganismes indésirables (Barthelmebs *et al.*, 2000 a, b). La forme libre des acides hydroxycinnamiques peut être modifiée par certains microorganismes en des composés moins toxiques. L'enzyme hydroxycinnamate décarboxylase, produite par divers microorganismes, est responsable de la transformation des acides hydroxycinnamiques libres, ce qui entraîne alors l'élimination de l'effet antimicrobien (Stead, 1995).

I.5.2. Les isomères de l'acide *p*-coumarique dans le vin

Dans la bibliographie, on parle très souvent des acides hydroxycinnamiques notamment l'acide *p*-coumarique sans toutefois spécifier la forme isomère. L'identification de l'isomère *cis* a été signalée dans plusieurs travaux (Peña-Neira *et al.*, 2000 ; Moreno et Barroso, 2002) dont l'objectif était l'étude ou la caractérisation des composés polyphénoliques du vin. L'analyse par LC-PAD-MS a permis de montrer que les 2 isomères possèdent des longueurs d'ondes d'absorption maximales λ_{\max} différentes : 295,4 nm et 309,6 nm pour les formes *cis* et *trans*,

respectivement (Hernández *et al.*, 2006). Jaitz *et al.* (2010) ont montré que les structures isomères du *cis-p*-coumarique et *cis*-resvératrol sont le résultat du vieillissement des formes *trans-p*-coumarique et *trans*-resvératrol.

D'autres travaux montrent que la présence de l'isomère *cis* est dépendante du cépage. En effet, les concentrations de chacun des isomères sont pratiquement les mêmes dans les vins appartenant à la même variété, à l'exception de ceux fabriqués à partir du cépage Garnacha. Néanmoins, Betés-Saura *et al.* (1996) et Ibern-Gómez *et al.* (2002) n'ont pas détecté l'isomère *cis* du *p*-coumarique dans les vins de base ou dans les vins mousseux fabriqués à partir des variétés de raisins blancs Macabeo, Xarel.lo, et Parellada (Pozo-Bayón *et al.*, 2003).

L'isomère *cis* de l'acide *p*-coumarique n'est pas commercialisé (Jaitz *et al.*, 2010) et sa quantification se fait à l'aide de la courbe de calibration de l'acide *trans-p*-coumarique (Alonso *et al.*, 2002, Del Barrio-Galán *et al.*, 2012). Les composés phénoliques n'ayant pas de standard peuvent être confirmés par LC-PAD (Liquid Chromatography - Pulsed Amperometric Detection) et LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry) (Hernández *et al.*, 2006). Dans les travaux de Pozo-Bayón *et al.* (2003), l'acide *cis-p*-coumarique (*cis*-4-hydroxycinnamique) a été obtenu à partir de l'isomérisation du *trans-p*-coumarique après 2 h d'exposition à la lumière UV (340 nm).

I.5.3. Réactions enzymatiques de production des phénols volatils

Steinke et Paulson (1968) étaient les premiers à identifier les acides phénoliques, *p*-coumarique (4-hydroxycinnamique) et férulique (4-hydroxy-3-méthoxycinnamique) comme précurseurs des 4-vinylphénols et 4-vinylguaiacols, respectivement. Les acides phénoliques peuvent être décarboxylés en 4-vinylphénols et 4-vinylguaiacols selon deux façons (Wackerbauer *et al.*, 1982): (1) par choc thermique lors des traitements à haute température dans le processus de production de la bière, ou (2) par décarboxylation enzymatique lors de la fermentation par des souches de levures ou des microorganismes de contamination. Chez *Brettanomyces/Dekkera*, l'origine de phénols volatils est liée à l'activité séquentielle de deux enzymes qui transforment successivement les précurseurs libres d'acides hydroxycinnamiques (*p*-coumarique, férulique et caféique) en hydroxystyrènes (4-vinylphénol, 4-vinylguaiacol et 4-vinylcatéchol). L'étape suivante sera la réduction de ces derniers en leurs dérivées éthyliques correspondants (4-

éthylphénol, 4-éthylguaïacol et 4-éthylcatéchol) (Dias *et al.*, 2003b) (**Figure 2**). La première enzyme est une hydroxycinnamate décarboxylase (HcD) (analogue à l'enzyme Pad1 de *S. cerevisiae*) qui est responsable du clivage du carbone C3 à partir de la chaîne latérale libérant ainsi du CO₂. La seconde, une vinylphénol réductase (VPR), réduit la double liaison du dérivé de vinyle pour former le dérivé d'éthyle correspondant (Edlin *et al.*, 1995) selon la réaction suivante :



La capacité de *Brettanomyces/Dekkera* spp. à former des éthylphénols a été démontrée pour la première fois par Heresztyn (1986a) et Chatonnet *et al.* (1992a) au cours de la fermentation d'un moût de raisin.

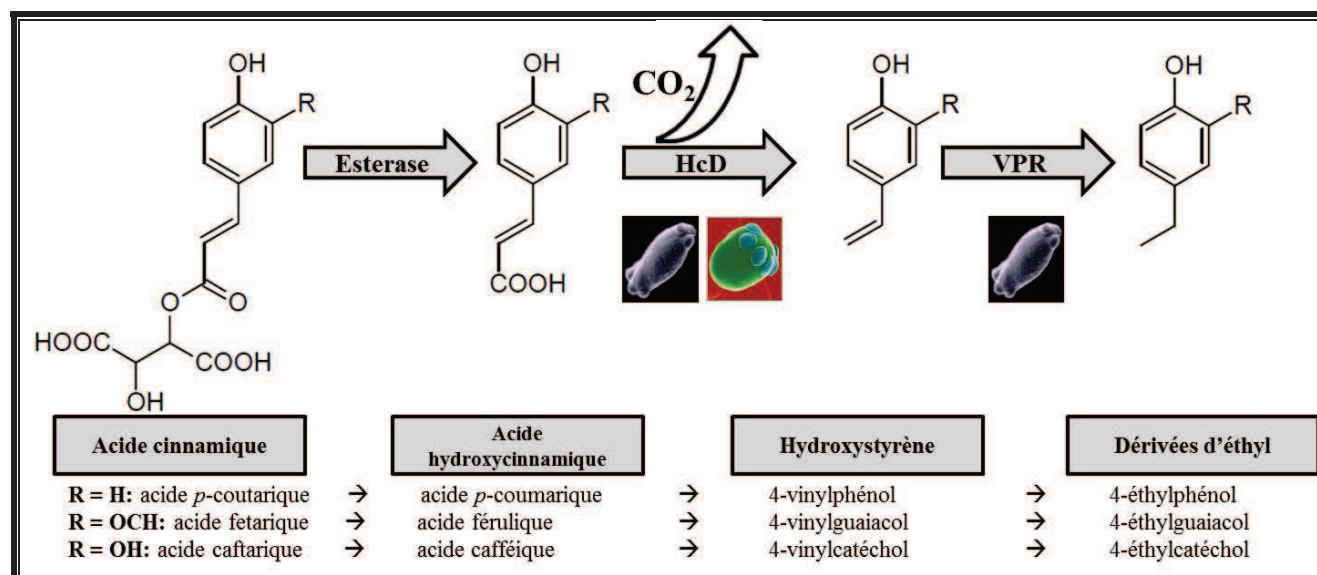


Figure 2. Formation des éthylphénols à partir de précurseurs d'acide cinnamique (Oelofse *et al.*, 2008).

Des études récentes (Harris *et al.*, 2009) montrent que certaines souches de *Brettanomyces* métabolisent les vinylphénols sans être responsables de la décarboxylation des acides hydroxycinnamiques. Ces auteurs ont montré le manque d'activité décarboxylase chez certaines souches de cette espèce sans toutefois généraliser au genre.

I.5.4. Différentes étapes de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol chez *Brettanomyces bruxellensis*

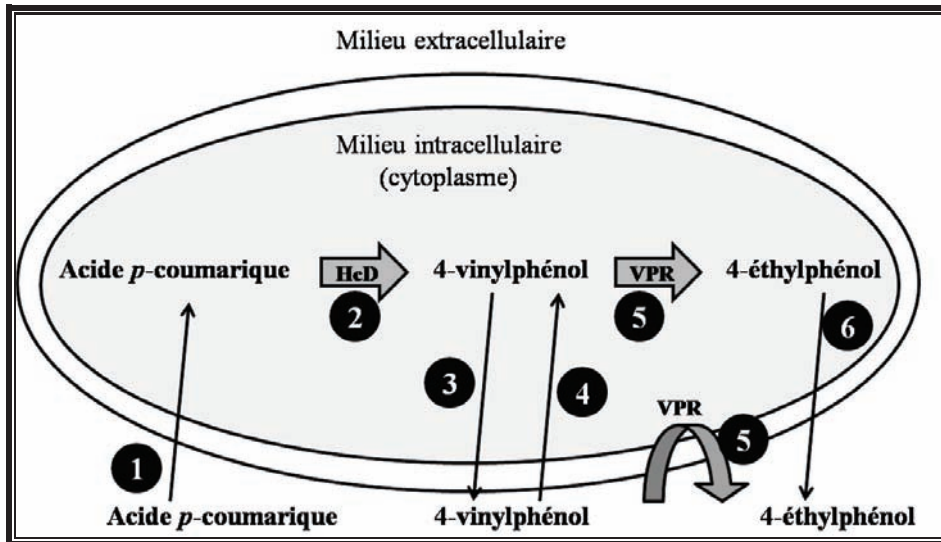


Figure 3. Schéma réactionnel de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol (Salameh, 2008).

La transformation de l'acide *p*-coumarique en 4-vinylphénol se produit dans le milieu intracellulaire puisque la cinnamate décarboxylase est une enzyme constitutive endocellulaire (Chatonnet *et al.*, 1992a, Edlin *et al.*, 1998). Ainsi, la **première étape** du schéma réactionnel de la **Figure 3** correspond à la pénétration de l'acide *p*-coumarique dans le cytoplasme donc à sa disparition du milieu extracellulaire. Ensuite, il est excrété dans le milieu extracellulaire (**étape 3**), juste après sa conversion en 4-vinylphénol (**étape 2**). Ceci explique la présence dans le surnageant des produits de la bioconversion. La vinylphénol réductase est aussi une enzyme constitutive (Tchobanov, 2007), mais aucune donnée actuelle ne permet à ce jour de conclure sur l'emplacement cytoplasmique ou membranaire de cette enzyme.

- Si on suppose que l'emplacement de l'enzyme est cytoplasmique, et afin que le 4-vinylphénol puisse être en contact avec cette enzyme, il doit franchir de nouveau la barrière de la cellule (**étape 4**) où il est converti en 4-éthylphénol (**étape 5**). En dernière étape, ce dernier est à son tour excrété dans le milieu extracellulaire (**étape 6**).
- Dans le cas où on suppose que l'enzyme est membranaire, le 4-vinylphénol devra seulement être en contact avec la levure pour être réduit.

Le schéma réactionnel est résumé alors en 6 étapes (ou 5) successives dont 4 (ou 3) correspondent à des entrées ou sorties de constituants de la cellule et deux autres à des réactions enzymatiques (Salameh, 2008).

I.5.5. Différences de rendement et de taux de conversion

Avant de s'arrêter sur les données existantes dans la littérature, il faut définir le rendement et le taux de conversion. Le rendement chimique d'une réaction est le nombre de moles de produit formé divisé par le nombre de moles de réactif limitant présent au début de la réaction. Le taux de conversion représente la fraction d'un réactif qui réagit lors d'une réaction chimique.

Le rendement de transformation des précurseurs en phénols volatils peut varier en fonction de la nature des souches de *Brettanomyces* mais il est surtout influencé par la quantité de précurseurs libres ainsi que par les paramètres physico chimiques du milieu (pH, degré d'alcool) et la température dont dépend directement la croissance de *Brettanomyces*. En outre, la quantité de précurseurs libres dans un vin dépend du cépage considéré, du millésime, de la maturité de la récolte et du mode de vinification employé.

Les rendements des produits de la bioconversion peuvent varier de manière significative d'une souche à l'autre. Des conversions molaires de 90 % ont été rapportées pour des souches de *D. bruxellensis*, *D. anomala* et *P. guillermondii* tandis que d'autres levures fermentaires étaient incapables de produire ces mêmes taux de conversion (Suárez *et al.*, 2007). Medawar (2003) a noté que, avec *B. intermedius*, et quelle que soit la concentration initiale de *p*-coumarique utilisée, la conversion en éthylphénol était de (83 ± 5) %. Cette valeur indique qu'il n'y a aucune inhibition par un excès de substrat (par exemple l'acide *p*-coumarique) ou une rétro-inhibition (ou répression) par les produits formés dans la gamme de concentrations étudiées.

Le rendement de bioconversion varie selon les études de 1 à 92 %. En effet, selon les auteurs, il n'y a jamais de conversion totale. Seule l'étude de Salameh (2008) a montré une conversion totale lorsque la quantité d'acide *p*-coumarique qui ne participe pas à la bioconversion s'adsorbe sur les parois des *Brettanomyces*. Les explications ne sont, pour le moment, que des hypothèses. Ainsi, une explication pourrait être que la quantité d'acide qui disparaît du bilan matière est convertie à l'intérieur du cytoplasme par d'autres voies métaboliques telles que celle de l'acide shikimique et de ses dérivés, les dérivées phénylpropanoïdiques, les stilbènes ou

encore celle de la phénylalanine et de ses dérivés flavonoïdes (Goldberg *et al.*, 1998, Medawar, 2003).

La conversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol dans le vin dépend à la fois de la source de carbone présente dans l'environnement et de la concentration d'oxygène dissous. Il est très difficile d'élucider la participation effective de chacun de ces facteurs dans la bioréaction et l'équilibre global de la bioconversion (Dias *et al.*, 2003a). *B. bruxellensis* ne peut pas utiliser l'acide *p*-coumarique comme seule source de carbone pour la croissance. Le rendement en 4-éthylphénol, calculée en se basant sur la quantité de 4-éthylphénol généré par l'acide *p*-coumarique ajouté à différents milieux, pour une souche de *B. bruxellensis*, s'élève à 2,2 % si la source de carbone est l'acide acétique, à 80 % si c'est l'éthanol et jusqu'à 92,5 % si la source est le glucose (Dias *et al.*, 2003a).

La phase où le rendement de la bioconversion est maximal varie selon les auteurs. En effet, Zoecklein (2000) montre que la production de 4-éthylphénol a lieu pendant la phase stationnaire et même pendant le déclin pour une souche de *B. intermedius*. Les mêmes résultats ont été obtenus par Salameh *et al.* 2008 pour une souche de *B. bruxellensis*. Alors que les observations de Medawar (2003) montrent une production de ces mêmes composés dans la phase exponentielle de croissance avec une vitesse de production plus importante que celle de la phase stationnaire.

1.5.6. Caractéristiques des enzymes hydroxycinnamate décarboxylase et vinylphénol réductase

Il a été démontré que l'enzyme VPR est seulement spécifique aux vinylphénols puisqu'en présence ou en absence de précurseurs (acides férulique et *p*-coumarique), elle n'a pas montré d'activité. En présence de vinylphénols, l'activité de cette enzyme s'est montrée maximale lorsque les cellules ont atteint la phase tardive de leur croissance (phase qui précède l'état stationnaire). Les conditions optimales de la VPR sont un pH de 5-6 et une température entre 25-30°C. Lorsque les intermédiaires (4-vinylphénol et 4-vinylguaiacol) sont réduits par la VPR (Godoy *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 2009), les co-facteurs NADPH/NADH sont oxydés (Godoy *et al.*, 2008). La littérature détaillant la préférence de VPR à NADH ou NADPH n'est pas claire. Selon Godoy *et al.* (2008), une augmentation de 25 % de l'activité VPR est observée quand

NADPH est oxydé par rapport au NADH alors que Tchobanov *et al.* (2008) ont constaté une augmentation de 50 fois de l'activité VPR en présence de NADH.

Quant à la HcD, elle est connue pour être une enzyme cytoplasmique constitutive chez les levures et membranaire inductible chez les bactéries (Edlin *et al.*, 1998). Son activité enzymatique augmente lorsque les cellules sont cultivées en présence de concentrations importantes de substrat et son activité maximale a été observée aussi dans la phase tardive de croissance. HcD a montré un pH et une température optimale de 6 et 40°C, respectivement (Godoy *et al.*, 2008). Bien que présente chez *Saccharomyces* et *Brettanomyces*, elle s'exprime différemment: elle est inhibée chez *Sacharomyces* par les composés polyphénoliques oligomériques du vin rouge et activée par les procyanidines et les catéchines chez *Brettanomyces* (Chatonnet *et al.*, 1992a).

Edlin *et al.* (1998) ont purifié une HcD de *B. anomalus*. L'enzyme était capable de décarboxyler les acides *para*-coumarique et férulique, mais elle est restée inactive avec les acides *ortho*-coumarique, *mé*ta-coumarique ainsi que les acides cinnamiques, indiquant que le groupement *p*-OH est essentiel pour son activité. En substituant le *p*-OH par un groupe méthoxy-, l'activité a également été inhibée.

Barankowski *et al.* (1980) ont montré que les acides hydroxycinnamiques sont considérés comme des agents antimicrobiens et que l'action de l'HcD détoxifie ces acides comme une réponse au stress (Barthelmebs *et al.*, 2000a). Cette fonction n'est pas bien comprise et peut avoir des implications dans la lutte contre les levures *Dekkera* et *Brettanomyces* (Harris *et al.*, 2009).

Selon Godoy *et al.* (2008), l'éthanol a un impact important sur les activités des deux enzymes. Après quelques minutes d'incubation de la fraction purifiée en présence de 10 ou 12 % d'éthanol (v/v), l'activité diminue de façon drastique et l'activité de l'HcD est complètement perdue après 1h tandis que l'activité VPR perd 80 % et 88 % en présence de respectivement 10 ou 12 % éthanol (v/v). Les faibles concentrations en éthanol permettent de favoriser les processus enzymatiques nécessaires, notamment la décarboxylation et/ou la réduction. Cela pourrait être lié à la capacité de *Dekkera/Brettanomyces* à utiliser l'éthanol comme source de carbone (Benito *et al.*, 2009b).

I.6. Présence de ces réactions enzymatiques chez d'autres microorganismes

Dans des conditions œnologiques, les réactions de décarboxylation existent chez de nombreuses bactéries, champignons et différentes espèces de levures. La levure de fermentation *S. cerevisiae* est capable de décarboxyler la chaîne latérale d'acides hydroxycinnamiques pour produire des dérivés vinyliques, mais elle est incapable de les réduire à des concentrations critiques de dérivés éthyliques (Dias *et al.*, 2003b, Edlin *et al.*, 1995, Chatonnet *et al.*, 1992a).

D'autres levures comme *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* et *Hansenula* sont également potentiellement capables de décarboxyler l'acide *p*-coumarique ainsi que le férulique. Certaines souches de *Lactobacillus brevis* et *Pediococcus pentosaceus* peuvent procéder à la décarboxylation de l'acide *p*-coumarique en vinylphénols mais se trouvent incapables de briser l'acide férulique (K O'Toole et Kun Lee, 2006). Il est beaucoup plus rare que les bactéries lactiques et acétiques, isolées à partir de vin, puissent synthétiser des quantités importantes de 4-éthylphénols (Chatonnet *et al.*, 1995). L'étape de réduction qui produit de grandes quantités de 4-éthylphénols est moins fréquente chez les microorganismes, mais se trouve particulièrement efficace chez les populations de *B. bruxellensis*, *B. anomala* (Oelofse *et al.*, 2008) et *B. intermedius* (Vanbeneden, 2007). Dans les moûts de raisin, des souches de *Pichia guilliermondi* présentent des similarités avec des souches de *D. bruxellensis* puisqu'elles peuvent produire des quantités considérables de 4-éthylphénols (Dias *et al.*, 2003a). Comme *P. guilliermondi* se trouve dans tous les équipements vinicoles, elle peut avoir une grande importance sur la détérioration de la qualité du vin à travers la production de phénols volatils. Cependant, ces espèces ne sont pas capables de produire des niveaux élevés de 4-éthylphénol dans le vin en raison de leur viabilité qui est rapidement perdue dans les conditions de fermentation (pH de 3.5, présence d'éthanol et de sulfite) (Barata *et al.*, 2006).

I.7. Autres molécules odorantes et autres défauts générés par *Brettanomyces*

La présence de vinylphénols provoque des odeurs de vanille, d'épices lourdes et grillées, de fumet animal, de sparadrap® (Band-aid) et de métal. Les éthylphénols sont quant à eux associés à des odeurs d'œillet fané, de cuir, de sueur de cheval, d'écurie, de sparadrap®, de plastique, de fourrure mouillée, de viande crue, de feutre et de gouache (Licker *et al.*, 1998 a,b).

En plus de phénols volatils, *Brettanomyces* est également capable de produire des niveaux élevés d'acide acétique dans les vins (Ciani et Ferrero, 1997). La présence de ces hauts niveaux n'est pas souhaitable, en raison des attributs sensoriels négatifs associés à une augmentation de l'acidité volatile des vins (Boulton *et al.*, 1996 ; Arvick et Henick-kling, 2002).

Les *Brettanomyces* spp. sont également responsables de la formation des molécules 2-acétyl-1,4,5,6-tétrahydropyridine et 2-acétyl-3,4,5,6-tétrahydropyridine, en présence de lysine et d'éthanol. Les tétrahydropyridines, qui peuvent être également produits par *Lactobacillus* spp. (Heresztyn, 1986b) donnent une odeur extrêmement désagréable qui rappellent l'odeur de l'urine de souris ou de l'acétamide (Boulton *et al.*, 1996 ; Licker *et al.*, 1998 a,b).

Les odeurs rances ou de fromage, de sueur ou encore putrides sont le résultat de la production, par *Brettanomyces* des acides gras à chaîne moyennes comme l'acide isovalérique (Renouf et Lonvaud-Funel, 2007).

D'autres défauts générés par *Brettanomyces/Dekkera* sont encore la formation de sédiments ou de trouble dans les vins. Ces levures peuvent aussi avoir un impact sur la couleur du vin rouge (Mansfield *et al.*, 2002). Les composés à l'origine du pigment rouge dans les raisins sont les anthocyanes monoglucosylés. Les *B. bruxellensis* présentent une activité de β -D-glucosidase avec la possibilité d'hydrolyser le glucose, ce qui conduit à la formation des anthocyanidines aglycones qui entraînent une perte de couleur et une instabilité (Boulton *et al.*, 1996 ; Mansfield *et al.*, 2002). De plus, les *Brettanomyces* peuvent engendrer un voile blanc en surface des vins contaminés (Galzy et Rioux, 1955). Ces derniers présentent également une production importante d'acidité.

I.8. Effet de quelques paramètres sur la croissance et/ou la bioconversion

I.8.1. Rôle des sucres

De façon générale, *Brettanomyces* croit plus lentement que *Saccharomyces* et peut nécessiter une à plusieurs semaines pour atteindre une population détectable. La majorité des souches peut croître sur un des monosaccharides suivants : glucose, fructose, galactose ou encore disaccharides comme le maltose, le cellobiose et le tréhalose (Conterno *et al.*, 2006). Lorsque le milieu est riche en glucose, *Brettanomyces* est capable de produire de grandes quantités d'acide acétique. Plusieurs observations ont montré que le glucose exerce une répression ou inhibition des systèmes d'assimilation des autres sucres. Ainsi, dans un mélange de cellodextrine-glucose, une consommation préférentielle du glucose est attendue (Barbin, 2006).

En plus de cette capacité à utiliser la plupart des hexoses ainsi que l'éthanol comme sources carbonées, *Brettanomyces* est capable de se développer avec seulement 1 g.L⁻¹ de sucre dans le milieu (Silva *et al.*, 2004). De plus, les deux espèces *Brettanomyces custersii* et *Dekkera intermedia* sont capables de métaboliser le cellobiose, un disaccharide, qui est le produit de la dégradation de la cellulose (un polysaccharide de structure du bois) (Suárez *et al.*, 2007). Cette capacité résulte d'une forte activité enzymatique liée à la production des β -glucosidases qui sont responsables de cette métabolisation chez *Brettanomyces* (Gondé *et al.*, 1982).

Dans la littérature, nous constatons que la nature et la concentration de sucres influencent la synthèse de 4-éthylphénol. En contrôlant plusieurs barriques au cours du vieillissement de vins rouges, il a été démontré qu'une concentration de 275 mg.L⁻¹ de sucre résiduel est suffisante pour permettre la production de 425 μ g.L⁻¹ de 4-éthylphénol. De plus, l'assimilation d'une concentration de sucres de 300 mg.L⁻¹ suffit pour produire une population de plus 3000 cellules.mL⁻¹ de *Brettanomyces* capables de donner 600 μ g.L⁻¹ de 4-éthylphénol, dépassant ainsi le seuil de perception acceptable avant altération du vin (Chatonnet *et al.*, 1995).

Dias *et al.* (2003a) ont montré que les taux de conversion (acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol) élevés ne sont produits que lorsque le glucose et l'éthanol sont utilisés en tant que sources de carbone et d'énergie. Contrairement aux résultats obtenus par Chatonnet *et al.* (1995), ces mêmes auteurs ont constaté que le taux de conversion en présence de tréhalose est très faible. Ils ont également montré que la présence de moins de 2 g.L⁻¹ de sucres fermentescibles n'est pas une restriction quant à la production de niveaux élevés de 4-éthylphénol par *B. bruxellensis*.

I.8.2. Conditions d'aérobic et d'anaérobic

Comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces* est tolérante à l'éthanol et peut survivre dans des conditions d'anaérobic facultative. Les deux espèces fermentent préférentiellement en présence de fortes concentrations de glucose dans des conditions d'aérobiose (Woolfit *et al.*, 2007). Les non-*Saccharomyces* sont censées être moins tolérantes à la limitation en oxygène. Ainsi la consommation d'oxygène par *S. cerevisiae* peut contribuer à la mort des non-*Saccharomyces* (Hansen *et al.*, 2001).

La microstructure poreuse des anciens et nouveaux fûts de chêne permet la pénétration de petites quantités de flux d'oxygène qui contribuent à la croissance de *Brettanomyces* (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006). L'utilisation des vieux fûts de bois peut également accroître la présence de ces espèces car ils sont quasi-impossibles à stériliser. Lorsqu'un vin est contaminé par *Brettanomyces*, l'exposition à des quantités excessives d'oxygène doit être évitée puisque l'addition d'oxygène au vin contenant de faibles concentrations de dioxyde de soufre (moins de 25 mg.L⁻¹ de SO₂ libre) pourrait soutenir la croissance et la survie de *Brettanomyces* (du Toit *et al.*, 2005).

Concernant l'influence des conditions d'aération, seule l'absence d'oxygène (anaérobic stricte) peut conduire à une réduction du taux de croissance et de la concentration en biomasse mais l'activité fermentaire des *Brettanomyces* n'est pas inhibée. Dans cette même condition d'anaérobic, une petite quantité d'oxygène dissous restante dans le vin en début de fermentation est capable de stimuler la fermentation alcoolique. Cette caractéristique biochimique particulière de *Brettanomyces/Dekkera* est connue sous « l'effet Custer » (Ciani *et al.*, 2003).

Nous rappelons que l'effet Custer est le résultat de la formation excessive de NADH, due à la formation de l'acide acétique qui provoque un déséquilibre redox (NAD⁺/NADH) et à l'incapacité à produire du glycérol (Scheffers, 1992). Ce phénomène a été justifié de la façon suivante : en présence d'oxygène la cellule pourrait plus facilement réoxyder ses coenzymes réduits dans la chaîne respiratoire, lui permettant d'augmenter le flux glycolytique (Gancedo et Serrano 1989).

La présence d'oxygène dans le milieu peut aussi affecter la production d'acide acétique. Dans les conditions de semi-aérobioses, (condition optimum de la fermentation alcoolique), des niveaux élevés d'acide acétique et d'éthanol sont produits, alors qu'une aération totale cause aussi des niveaux élevés d'acide acétique mais de petites quantités d'éthanol. Cette concentration élevée

d'acide acétique peut conduire à une forte acidification du milieu et peut probablement bloquer l'activité métabolique. L'acide acétique peut être produit par les levures à travers l'oxydation de l'acétaldéhyde par l'action des enzymes aldéhyde déshydrogénase. Des résultats ont montré que l'activité spécifique de l'aldéhyde déshydrogénases en condition d'aérobiose est 50 fois plus élevée que celle en anaérobiose (Ciani et Ferraro, 1997).

De plus, les *Brettanomyces* comme les *Saccharomyces* sont « **Crabtree positive** ». Ce terme veut dire qu'en conditions d'aérobioses et lorsque le glucose est présent à fortes concentrations, les levures possèdent la capacité de passer du mode respiratoire (lorsqu'il y a une répression du métabolisme oxydatif) au mode « fermentation alcoolique » (production d'éthanol) (Gilis, 1999).

I.8.3. L'azote

L'ion ammonium, les protéines et les acides aminés peuvent être utilisés comme source d'azote nécessaire à la levure. Pour les levures, les protéines sont des éléments constitutifs de la cellule et de ses organites (protéines de structure) ou des enzymes qui interviennent comme transporteurs ou dans des réactions métaboliques (protéines fonctionnelles). L'azote est donc un facteur clef pour la multiplication et l'activité physiologique de la levure. Le taux de croissance ainsi que la composition de la levure sont liés non seulement à la nature de la source d'azote, mais aussi à la concentration de celui-ci (Swoboda, 1922).

Lorsqu'on parle d'azote, on englobe l'ensemble des molécules contenant un ou plusieurs atomes d'azote. Pourtant, tout l'azote n'est pas utilisable par les levures. Seuls les ions ammonium, les acides aminés et certains peptides de faible poids moléculaire, peuvent être incorporés dans la cellule de la levure et y être métabolisés. L'azote assimilable est défini alors comme la quantité d'azote en mg.L^{-1} à la fois disponible et susceptible d'être utilisé par la levure. L'azote assimilable est constitué d'azote ammoniacal et d'azote organique sous forme d'acides aminés.

Brettanomyces a besoin de très peu d'azote aminé pour son développement (Guilloux-Benatier, *et al.*, 2001), d'autant plus que ces composés sont abondamment présents dans le raisin, donc ne limitent pas la croissance cellulaire.

Il est aussi dit que la présence de l'ion NH_4^+ résiduel après la fin de la fermentation peut permettre le développement de levures de contamination comme *Brettanomyces* (IFV, Fiche pratique, Azote ammoniacal en œnologie).

Les travaux d'Aguilar-Uscanga *et al.* (2000) ont montré l'influence d'une carence en extrait de levure et/ou de l'ammonium sur une souche de *B. bruxellensis* par rapport à un milieu témoin. Cette carence induit une production importante d'acide acétique, un arrêt de la consommation du glucose et une diminution du rendement en éthanol. Aussi, l'ajout de 2 et de 5,5 g.L⁻¹ de sulfate d'ammonium au milieu fermentaire montre un effet inhibiteur chez les souches de *B. bruxellensis* et de *B. intermedius*, respectivement. Dans ce cas, le milieu de fermentation étudié est constitué de 50 g.L⁻¹ de glucose, 2 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,4 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O et 1 g.L⁻¹ d'extrait de levures avec un pH initial de 4.

Les travaux de Barbin *et al.* 2007 ont montré qu'un complément nutritionnel ou même l'ajout d'adjuvants œnologiques peuvent avoir des impacts sur le développement de *Brettanomyces* lors de la vinification. Lors de cultures en milieu synthétique liquide, la thiamine s'est montrée stimulatrice de croissance chez *Brettanomyces* mais modifie peu la production d'éthylphénols. Par ailleurs, le sulfate d'ammonium comme l'ajout de tannins œnologiques stimulent la croissance de *Brettanomyces*, mais seul l'azote a une influence positive sur la production de phénols volatils.

I.8.4. Effet du pH

Les environnements à faible pH sont les conditions le plus souvent associées aux levures *Brettanomyces*. Peu d'études antérieures ont été menées pour observer les effets de faibles pH sur le rendement de fermentation de ce genre de levure (Chad, 2010).

En 1999, Gillis montra que la croissance de *Brettanomyces* dans le jus de raisin était possible pour des valeurs de pH comprises entre 2,6 et 4,5 (Gillis, 1999). En 2004, Silva *et al.* ont déterminé un taux de croissance spécifique stable entre les valeurs de pH 3,5 et 4,5 (Silva *et al.*, 2004). Enfin, en 2006, l'étude de Conterno *et al.* avait montré que 33 souches provenant de diverses origines étaient capables de se développer à pH 2,0 (Conterno *et al.*, 2006). Ces études convergentes démontrent que les pH couramment rencontrés en œnologie sont sans effet sur la multiplication de *Brettanomyces*. En général, le pH ne semble pas avoir un effet direct limitant la croissance de *Brettanomyces* dans un vin mais un pH faible possède un effet important sur l'action du SO₂ favorisant sa présence sous forme moléculaire libre (Benito *et al.*, 2009b).

Du côté enzymatique, l'effet du pH varie selon les souches utilisées. En absence de facteurs limitant, une souche de *D. bruxellensis* D37 ne présente aucune activité de HcD/ VPR lorsque le

pH est compris entre 1,75 et 2,17. A pH égal ou supérieur à 2,17, pas de grandes différences ont été observées entre les activités, et tout l'acide *p*-coumarique a été converti en 4-éthylphénol. Toutefois, à pH 2,17, il y avait un retard dans l'initiation du métabolisme de l'acide *p*-coumarique. A pH 2,5, pour d'autres souches, les enzymes HcD et VPR ont montré une activité avec l'acide *p*-coumarique alors complètement transformé en 4-éthylphénol.

I.8.5. Effet de la température

Les techniques utilisées au cours de la vinification afin d'améliorer l'extraction des composés phénoliques peuvent directement conduire à l'augmentation de la production de phénols volatils dans les vins affectés par la levure *Brettanomyces*. Ces techniques sont la thermovinification, la macération et l'augmentation de température au cours du stockage du vin. Une augmentation de température à la fin de la macération conduit à une augmentation de l'extraction des acides phénoliques et par conséquent une augmentation de la production des phénols volatils par la levure *Brettanomyces* (Gerbaux *et al.*, 2002).

La température a aussi un impact sur la croissance de *Brettanomyces*. Avec des températures élevées, le temps pour atteindre la concentration maximale de biomasse est diminué sachant que la température optimale présente une gamme entre 25 et 32°C. Cette augmentation de température change la vitesse à laquelle sont produits les composés métaboliques mais ne modifie pas la quantité produite (Brandam *et al.*, 2008).

I.8.6. L'éthanol

Plusieurs travaux montrent la sensibilité des levures *Brettanomyces* aux niveaux élevés d'éthanol. Les vins ayant des niveaux élevés en éthanol ne sont pas capables de produire des niveaux élevés en 4-éthylphénols. L'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance de *Brettanomyces* ainsi que sur la production des 4-éthylphénols a été étudié dans des milieux à différentes concentrations en éthanol : 4, 6, 8, 10, 12 et 13 % (v/v). Jusqu'à 10 % du volume total, les taux de croissance diminuent, mais cela n'a aucun effet sur la production des 4-éthylphénols. A 12 % (v/v), la croissance et la production des 4-éthylphénols sont considérablement diminuées et une inhibition totale est observée à partir de 13 % (Dias *et al.*, 2003a). La croissance de *B. bruxellensis* a montré plus de résistance à l'éthanol que *S. cerevisiae*.

Medawar *et al.* (2003) ont étudié la relation entre la durée de la phase de latence de *B. intermedius* et la concentration en éthanol dans un milieu alcoolique. Les résultats ont montré que le pourcentage critique d'éthanol est de 11,5 %. Au-delà de cette valeur, la croissance est inhibée.

I.8.7. Rôle de quelques facteurs nutritifs

La croissance de *Brettanomyces* est affectée par la variation des concentrations de plusieurs facteurs nutritifs. L'extrait de levures s'est montré être un composé essentiel pour la croissance. La concentration de la biomasse augmente linéairement quand ce dernier est ajouté au milieu de culture (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000). Les ions magnésium et phosphate semblent être essentiels pour le développement de *B. bruxellensis*. Ils sont apportés en quantité suffisante dans les milieux de fermentation naturels ou par l'extrait de levure dans les milieux synthétiques.

Concernant le rôle des vitamines, Barnett (1990) montra que des souches de *B. bruxellensis* et *B. anomala* peuvent croître en absence de *myo*-Inositol, de panthothenane, de pyridoxine et de niacine (B3). Par contre, la présence de biotine (B8) et de thiamine (B1) est indispensable à la croissance de ces souches.

I.9. Stabilité des réactifs et des produits de la bioconversion

I.9.1. Stabilité de l'acide *p*-coumarique

Dans leurs travaux, Salameh *et al.* (2008) ont montré que l'acide *p*-coumarique est stable aux températures de vinification (entre 20 et 30°C), mais instable à la température d'autoclavage. Cette même étude a montré que cet acide peut réagir avec de l'éthanol, comme tous les polyphénols du vin. Cette réaction semble être une réaction d'estérification et son taux devient plus élevé lorsque la concentration en éthanol augmente dans le milieu. D'autre part, ce travail a montré pour la première fois qu'un phénomène d'adsorption de l'acide *p*-coumarique peut avoir lieu sur les parois de levures *Brettanomyces*. Seulement 50 à 90 % de l'acide *p*-coumarique ajouté au début de la fermentation se sont retrouvés disponibles pour la bioconversion en éthylphénol dans le cas de l'utilisation d'un milieu synthétique « vin ». L'adsorption sur les parois de *Brettanomyces* semble être responsable de cette perte importante. Cette étude a été

réalisée seulement avec une seule et même souche de *Brettanomyces* et la question de la diversité de comportement de différentes souches par rapport à ce phénomène se pose.

Dans les travaux de Vončina *et al.* (2009), les résultats des tests de stabilité ont montré que l'isomère *trans-p*-coumarique est progressivement converti en sa forme *cis* quand il est dissous dans du méthanol, stocké à la lumière du jour et à température ambiante. Ce même acide dissous dans le méthanol et stocké pendant 1 semaine dans l'obscurité et à -18°C est stable. Bien que les formes *cis* et *trans* des acides phénoliques sont des isomères géométriques avec des structures très similaires, ils peuvent être bien distingués par ordre d'élution lors de l'analyse par HPLC (les isomères *cis* sont retenus plus longtemps que les isomères *trans*). (Cette étude a donné les mêmes résultats pour l'acide férulique).

Tous ces changements pouvant affectés la « vraie » quantité de l'acide *p*-coumarique dans un milieu d'étude empêchent les auteurs d'évaluer son apport réel dans la bioréaction.

I.9.2. Stabilité des phénols volatils dans le vin

La stabilité des éthylphénols dans les vins rouges influence leurs concentrations ainsi que le profil sensoriel résultant. Cet aspect reste pour le moment mal compris. Cependant, le 4-éthylphénol peut se décomposer en 4-hydroxyacétophénone par l'enzyme 4-éthylphénol méthylènehydroxylase (4-EPMH) (**Figure 4**). De même, une autre enzyme, la *p*-crésol méthylhydroxylase (PCMH) provoque la dégradation du 4-éthylguaiacol en 4-vinylguaiacol et 4-acétovanillone (**Figure 4**). Par leurs propres arômes spécifiques (**Tableau 3**), ces produits de dégradation peuvent être un signe pour reconnaître les vins contaminés par *Brettanomyces* (Rayne et Eggers, 2007a).

Tableau 3. Phénols volatils et produits de décomposition liés au caractère « Brett ».
HcD=hydroxycinnamate décarboxylase, VPR=vinylphénol réductase.

Composés	Source	Odeur	Référence	Statut
4-éthylphénol (4-EP)	conversion du 4-VP par VPR	cuir, Elastoplast TM ou band-aid TM	Chatonnet <i>et al.</i> , 1992a,b	composé principal provoquant la contamination
4-éthylguaiacol (4-EG)	conversion du 4-VG par VPR	médicinale	Chatonnet <i>et al.</i> , 1992a,b	composé principal provoquant la contamination
4-éthylcatéchol (4-EC)	conversion du 4-VC par VPR	sueur de cheval, fumé	Hesford <i>et al.</i> , 2004	récemment accepté d'être lié à Brett
4-vinylphénol (4-VP)	conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique par HcD	coquille d'amande	Chatonnet <i>et al.</i> , 1992a,b	accepté comme composé mineur de contamination
4-vinylguaiacol (4-VG)	conversion de l'acide férulique par HcD	fleurs, épices	Chatonnet <i>et al.</i> , 1992a,b	accepté comme composé mineur de contamination
4-vinylcatéchol (4-VC)	conversion de l'acide caféique par HcD	phénolée, médicinale, fumé	Hisomoto <i>et al.</i> , 2009	non accepté en tant que composé des Brett
4-hydroxyacétophénone	décomposition du 4-EP	florale, sucrée	Rayne et Eggers, 2007a	non considéré comme composé des Brett
4-acétovanillone	décomposition du 4-EP	Vanille	Rayne et Eggers, 2007a	non considéré comme composé des Brett

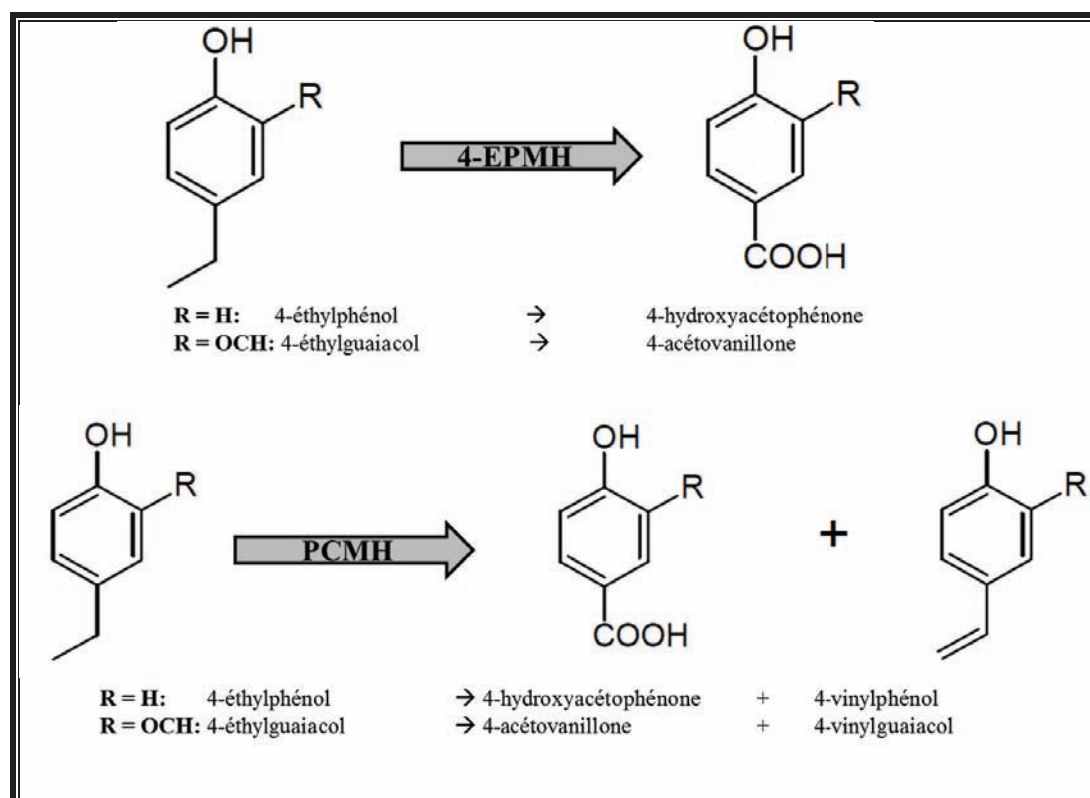


Figure 4. Produits de décomposition des dérivées d'éthyle par les enzymes 4-EPMH et PCMH.

I.10. Dosage des réactifs et des produits de la bioconversion

I.10.1. Dosage de l'acide *p*-coumarique dans le contexte œnologique

L'analyse des concentrations de l'acide *p*-coumarique se fait souvent par les mêmes méthodes d'analyses utilisées pour doser les composés phénoliques, que ce soit dans les boissons alcoolisées ou dans tout le domaine alimentaire. Les informations données par la littérature sont abondantes quant à la détermination des acides hydroxycinnamiques. La méthode HPLC est prédominante (Hayes *et al.*, 1987 ; Floridi *et al.*, 2003 ; Garcia *et al.*, 2004) puisqu'elle élimine la nécessité d'une longue préparation des échantillons et/ou des étapes de prétraitement requises, comme c'est le cas pour la chromatographie en phase gazeuse lors de l'analyse des composés volatils. Plusieurs méthodes chromatographiques ont été mises au point (Lunte *et al.*, 1988 ; Jandera *et al.*, 2005). Elles diffèrent surtout par le détecteur, le temps d'analyse et la nature du solvant. Toutes ces méthodes estiment la quantité de la totalité des polyphénols présents dans l'échantillon à tester. La méthode HPLC couplée à la détection électrochimique (HPLC-ECD), par exemple, est devenue une technique largement utilisée en raison de sa grande sensibilité ainsi que sa sélectivité supérieure à l'absorption par UV pour les composés qui sont électrochimiquement oxydables (Kilmartin, 2001). Cependant, des métabolites inconnus produits lors de la fermentation peuvent interférer avec l'acide *p*-coumarique et nuire parfois à la quantification de ce dernier par cette méthode (Vanbeneden, 2007).

Ainsi, en 1988 une première méthode chromatographique simple couplée à un détecteur fluorimétrique a permis l'évaluation spécifique de l'acide *p*-coumarique dans un milieu œnologique (Garcia-Sanchez *et al.*, 1988). Par la suite, en 2008, Salameh *et al.* ont optimisé une méthode HPLC-UV simple, rapide et fiable pour la détermination de ce composé seul dans un milieu synthétique vin.

I.10.2. Dosage des phénols volatils

I.10.2.1. Dosage des produits 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol par analyse chimique

I.10.2.1.1. Par chromatographie en phase gazeuse

La méthode la plus courante pour la détermination des phénols volatils dans le vin est la chromatographie en phase gazeuse, qui peut être couplée soit à un détecteur à ionisation de flamme (FID) (Martorell *et al.*, 2002; Monje *et al.*, 2002), soit à la spectrométrie de

masse (MS) (Etiévant, 1981), soit à la spectrométrie de masse tandem (MS-MS) (Pizarro *et al.*, 2007) qui offre une sensibilité plus élevée, mais reste rarement utilisée en raison de son coût soit enfin à l'olfactométrie (GC-O).

En termes de préparation des échantillons, l'extraction liquide-liquide (LLE) est fréquemment utilisée. La microextraction liquide-liquide dispersive (DLLME) a également été utilisée comme une méthode alternative pour la préparation de l'échantillon (Fariña *et al.*, 2007). Bien que cette méthode ne permette pas des limites relativement basses de quantification et de détection, son petit volume d'échantillon, le temps d'extraction de courte durée (6 minutes) et la faible utilisation de solvants, la rend moins chère que la LLE.

La Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) a été étudiée par Díez *et al.* (2004), mais les limites de détection et de quantification rapportées sont significativement plus élevées que pour d'autres méthodes. Dans le cas du 4-éthylguaiacol ($159 \mu\text{g.L}^{-1}$), cette limite était beaucoup plus élevée que le seuil de détection sensorielle (33pg.L^{-1}). La méthode présente aussi un temps d'extraction de 60 minutes, ce qui est relativement élevée et la rend rarement utilisée.

La Microextraction en Phase Solide (SPME) est la technique la plus utilisée puisqu'elle nécessite une simple préparation des échantillons sans utilisation d'un solvant (Martorell *et al.*, 2002; Carillo *et al.*, 2006). Elle permet la détection de concentrations parfois très faibles dans le vin (de l'ordre de $\mu\text{g.L}^{-1}$). L'utilisation de la SPME permet de concentrer les échantillons et de limiter les pertes de ces composés extrêmement volatils. L'analyse se fait par adsorption sur une fibre. Le choix de la nature de la fibre est cependant important. Elle doit être bien adaptée à ce type de composés polaires. Ces fibres peuvent être à base de divinylbenzène-carboxen-poly(diméthylsiloxane) (DVD/CAR/PDMS) (Carillo *et al.*, 2006), de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Martorell *et al.*, 2002) ou de polyacrylate (Monje *et al.*, 2002).

Dans la GC-O, le détecteur olfactif est composé d'un masque en verre inerte couplé à un humidificateur, et d'un capillaire inerte (pas de phase stationnaire dans la colonne) qui établit la connexion entre le système chromatographique et le masque par l'intermédiaire d'une interface chauffée. Dans ce cas, le détecteur est le nez de l'opérateur. En respirant tout au long de l'analyse les composés séparés par la chromatographie gazeuse, l'opérateur est capable de noter les odeurs spécifiques de chaque composé. La GC-O est souvent utile parce qu'elle donne des idées sur la dilution de l'échantillon ainsi que sur la fréquence et l'intensité de détection (van

Ruth, 2001). Les sensibilités différentes des êtres humains peuvent être l'inconvénient de cette technique. De même, l'être humain peut avoir une mauvaise reproductibilité.

La Head space mass spectrometry electronic nose (electronic nose) est un instrument utilisé par quelques études pour examiner ou caractériser l'arôme du vin (Cynkar *et al.*, 2006). Ce nez tente essentiellement de comprendre les informations chimiques en imitant les sens humains et en utilisant des tableaux sensoriels de reconnaissance pour détecter les odeurs et les saveurs. Bien que cette méthode soit rapide et facile, des faux négatifs ainsi que des faux positifs peuvent apparaître et seulement trois niveaux de contamination peuvent être détectés : faible, moyen et haut. Cette méthode pourra être utile dans le futur mais à l'heure actuelle, elle n'est pas suffisamment développée pour être utilisée. Ces appareillages décrits sont assez coûteux et restent donc l'apanage des gros laboratoires d'œnologie.

Par ailleurs, pour toutes ces méthodes mesurant les concentrations en phénols volatils, il est difficile de remonter à une population de *Brettanomyces*. En effet, chaque souche de *B. bruxellensis* ne produit pas la même quantité de 4-éthylphénol (Benito *et al.*, 2009a) et rien ne prouve que les cellules responsables de la présence des 4-éthylphénols dans un échantillon soient toujours vivantes. Ces méthodes indirectes ne permettent donc pas de remonter à une quantité de *Brettanomyces* présentes dans le milieu.

I.10.2.1.2. Par chromatographie en phase liquide

Les méthodes de dosage par chromatographie en phase liquide utilisées très récemment, ont fait l'objet d'intérêt pour la détermination des éthylphénols. Ces méthodes sont avantageuses puisqu'elles ne nécessitent pas de préparation de l'échantillon. Une HPLC couplée à un détecteur coulométrique a été développée par Larcher *et al.* (2007) pour la détermination du 4-éthylphénol et 4-éthylguaïacol. Caboni *et al.* (2007) ont mis au point une méthode de dosage par LC-MS/MS ainsi que par HPLC-DAD et HPLC-fluorescence.

Toutefois, les limites de quantification de ces méthodes sont élevées par rapport à la GC-MS, et particulièrement élevées par rapport à la GC-MSMS de Pizarro *et al.* (2007). Une méthode HPLC-DAD a été récemment développée pour l'analyse du 4-vinylcatéchol, le précurseur du 4-éthylcatéchol (Hisomoto *et al.*, 2009). Les éthylphénols pourraient également être détectés

par cette méthode. Le **Tableau 4** résume les différentes méthodes analytiques avec pour chacune les limites de détection et de quantification obtenues.

Tableau 4. Méthodologies analytiques permettant le dosage des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols.

Méthode	LD (4-EP)	LD (4-EG)	LQ (4-EP)	LQ (4-EG)	Référence
DLLME ^a GC-MS	44	28	147	95	Fariña <i>et al.</i> , (2007)
SBSE ^b GC-MS	6	159	21	529	Diez <i>et al.</i> , (2004)
HS-SPME ^c GC-FID	2	1	5	5	Martorell <i>et al.</i> , (2002)
HS-SPME GC-MS	7	1	15	2	Carillo <i>et al.</i> , (2006)
MHS-SPME ^d GC-MS/MS	0,06	0,06	0,2	0,18	Pizarro <i>et al.</i> , (2007)
LC-MS/MS	10	10	50	50	Caboni <i>et al.</i> , (2007)
HPLC-DAD	10	10	50	50	Caboni <i>et al.</i> , (2007)
HPLC- fluorescence	1	10	5	50	Caboni <i>et al.</i> , (2007)
HPLC-CEAD ^e	1,3	1,57	2,59	3,13	Larcher <i>et al.</i> , (2007)

^a Dispersive liquid-liquid microextraction, ^b Stir bar sorptive extraction, ^c Head-space solid-phase microextraction, ^d Multiple head-space solid-phase microextraction, ^e Coulometric array detector

I.10.2.2. Dosage des produits 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol par analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle est souvent utilisée pour la caractérisation et l'évaluation des aliments et des boissons dans le but, par exemple, de formuler des produits, d'étudier la durée de vie, ou pour le lancement de nouveaux produits (Meilgaard *et al.*, 1999).

Les produits peuvent être évalués avec un des cinq sens, mais dans le cas du vin, l'arôme et le goût sont les plus importants. Il existe deux interactions physiologiques avec l'odeur, à travers les voies orthonasales et les voies rétronasales. Orthonasale correspond à l'odeur perçue dans l'espace libre du nez alors que rétronasale représente l'odeur dans l'espace libre de la bouche. « Le goût est basé sur un nombre limité de composés chimiques qui se lient à des récepteurs simples, mais pour un arôme, il y a 10 000 odeurs et plus de 900 gènes qui codent pour la structure des récepteurs olfactifs » (Yeomans, 2006).

Identifier les vins contenant des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols est fortement basé sur l'odeur orthonasale mais la combinaison des saveurs ainsi que du goût rétronasal doit être pris en compte. En analyse sensorielle, les vins sont dégustés avant d'être senti parce que l'interaction cognitive entre goût et arôme ne peut pas être dissociée (Noble, 1996). Outre la production de 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol, *B. bruxellensis* peut également produire des acides gras à chaîne moyenne et courte, comme les acides dodécanoïque, isobutyrique, isovalérique, 2-

méthylbutyrique, l'alcool isoamylique, le 2-phényléthanol, le *cis*-2-nonéanal, le *trans*-2-nonéanal, la B-damascénone, et l'éthyle décanoate (Fugelsang et Zoecklein 2003). Des études récentes ont montré que les acides isobutyrique et isovalérique peuvent produire un effet de masquage sur les seuils de détection des 4-éthylphénols (Romano *et al.*, 2008).

I.10.3. Arômes et seuil de perception des phénols volatils

Les phénols volatils à haute concentrations, sont responsables de défauts organoleptiques d'un vin. En effet, le 4-vinylphénol et le 4-vinylguaiacol (responsables des odeurs de gouache et de clou de girofle) possèdent des seuils de perception olfactive de 770 et 440 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement. Ces deux molécules peuvent contribuer positivement à l'arôme des vins mais peuvent avoir un impact négatif sur la qualité organoleptique lorsque leurs concentrations deviennent supérieures à leurs seuils de perception olfactive (Blaise, 1998 ; Guedes de Pinho, 1994). Ses teneurs ne sont pas stables en fonction du temps et peuvent changer surtout au cours de la conservation ou du vieillissement du vin. Par exemple, les teneurs en vinylphénols diminuent significativement (Dugelay *et al.*, 1993) pour former notamment les éthoxyéthylphénols (Dugelay *et al.*, 1995) et les éthylphénols générés par la levure *Brettanomyces* (**Figure 5**). Les premiers sont formés par addition de l'éthanol sur la double liaison vinylique des vinylphénols. Ils ne sont pas connus pour avoir un impact sur les arômes aux concentrations trouvées dans le vin alors que les éthylphénols sont formés en faibles concentrations lors de la fermentation malolactique, mais peuvent atteindre de très fortes teneurs lors de la conservation du vin liées à une contamination par la levure *Brettanomyces*. On parle de fortes teneurs quand la concentration des éthylphénols est supérieure à 425 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour des vins rouges. Dès lors, dans ces vins rouges contaminés, on retrouve des teneurs allant d'une dizaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$ jusqu'à 6 mg.L^{-1} de 4-éthylphénol. En général, on retrouve 8 à 10 fois plus de 4-éthylphénol que de 4-éthylguaiacol dans les vins rouges (Chatonnet *et al.*, 1992a ; Etiévant *et al.*, 1989) alors que la proportion devient 4/1 lorsqu'il s'agit de vins blancs. Ces deux molécules sont responsables d'un défaut d'arôme défini par des notes «écurie, animal et cuir».

Le 2-éthylphénol et l'alcool benzylique existent sous forme de précurseurs glycosylés dans le raisin mais leur contribution aux qualités organoleptiques du vin est très faible par rapport à celle générée lors de la fermentation alcoolique par la levure.

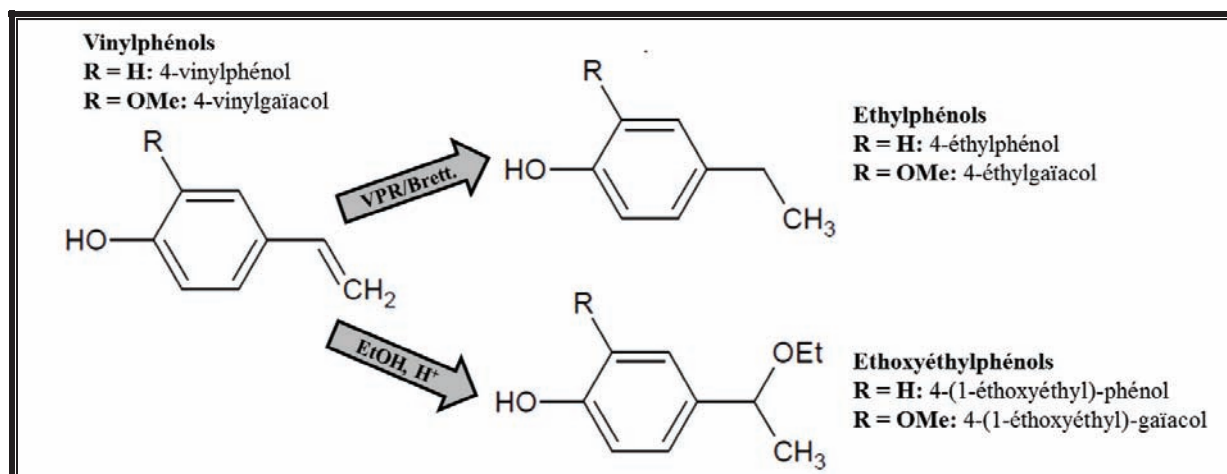


Figure 5. Formation des phénols volatils durant la conservation du vin.

I.11. Teneurs de l'acide *p*-coumarique et des phénols volatils dans les vins rouges du monde

I.11.1. Facteurs affectant la quantité de l'acide *p*-coumarique dans les vins rouges

I.11.1.1. Le cépage

L'expression spécifique de chaque cépage est le facteur dominant affectant la composition du vin. Pour étudier l'influence des différents cépages sur la teneur des polyphénols dans les vins rouges, la culture des raisins dans la même région géographique et sur la même période est exigée. La composition des vins issus de cinq cépages (Pinot Noir, Gamay Noir, Merlot, Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc), cultivés dans la même région de viticulture réglementée de Niagara dans le sud d'Ontario au Canada, et transformés par les mêmes techniques de production, a été examinée. La concentration d'acide *p*-coumarique variait entre 2,61 mg.L⁻¹ (Pinot Noir) et 4,5 mg.L⁻¹ (Gamay Noir) (Vinci *et al.*, 2008). Une analyse faite sur des vins rouges australiens a montré que la teneur en acide *p*-coumarique était la plus faible dans un vin de Pinot Noir, en comparaison avec des vins issus de Shiraz ou de Cabernet Sauvignon. De même, dans des vins de Californie et des vins d'Afrique de Sud, le vin issu de cépage Pinot Noir était le moins riche en cet acide phénol (Pollnitz *et al.*, 2000a).

I.11.1.2. Les conditions climatiques, le site géographique

La température, les précipitations et l'humidité sont des facteurs qui peuvent affecter la maturité du raisin et par conséquent la concentration des composés phénoliques.

En vue de déterminer l'effet du climat sur la composition phénolique du vin, une analyse a été faite sur des vins provenant des vignobles localisés dans trois régions climatiques de l'Afrique de Sud différenciées par la température moyenne du mois de février. Les vins analysés étaient issus du cépage Pinotage et ils appartenaient aux millésimes 2002 et 2003.

Les valeurs obtenues de la concentration d'acide *p*-coumarique et de celle de l'acide coutarique (coumaroyltartrique) sont regroupés dans le **Tableau** suivant :

Tableau 5. Teneur de l'acide *p*-coumarique et de l'acide coutarique dans des vins Pinotage 2002, 2003 (De Beer *et al.*, 2006). Les résultats sont donnés en mg.L⁻¹ (moyenne des mesures ± écart type).

	Acide coutarique	Acide <i>p</i> -coumarique
2002: Région climatique		
Région II (T=19-20,9°C)	22,31 ± 0,73	1,8 ± 0,37
Région III (T=21-22,9 °C)	17,92 ± 0,82	2,11 ± 0,34
Region IV (T=23-24,9°C)	16,24 ± 0,64	2,21 ± 0,33
2003: Région climatique		
Région II (T=19-20,9°C)	16,61 ± 0,62	1,2 ± 0,17
Région III (T=21-22,9 °C)	16,16 ± 0,58	1,5 ± 0,17
Region IV (T=23-24,9°C)	15,52 ± 0,33	1,51 ± 0,17

La concentration de l'acide coutarique dans le vin de millésime 2002 était la plus élevée dans la région II la moins chaude, à l'opposé de la concentration de l'acide *p*-coumarique libre qui était la plus faible dans cette région. En revanche, la variation des conditions climatiques n'a pas beaucoup influencé la teneur de ces acides phénols dans le vin de millésime 2003.

Dans une autre étude, la détermination de la concentration d'acide *p*-coumarique dans des vins de cépage Cabernet-Sauvignon provenant de différents sites géographiques a montré que les facteurs génétiques sont plus importants que le climat (Goldberg *et al.*, 1998). Le **Tableau 6** montre que dans la plupart des pays, la quantité de l'acide varie entre 4 et 5 mg.L⁻¹ à l'exception du Canada où la teneur est d'environ 2,5 mg.L⁻¹.

Tableau 6. Teneur de l'acide *p*-coumarique dans des vins (Cabernet-Sauvignon) issus de différentes régions géographiques.

Site géographique	Concentration de l'acide <i>p</i> -coumarique (mg.L ⁻¹)
Australie	4,7 ± 0,4
Californie	4,7 ± 0,4
Canada	2,3 ± 0,4
Europe centrale	4,6 ± 0,8
Afrique de sud	4,8 ± 0,7
Amérique de Sud	4,2 ± 0,3

I.11.1.3. La date de récolte

La date de vendange, directement corrélée avec le degré de maturité des grappes, a une grande influence sur l'évolution des acides phénols (Tian *et al.*, 2009). Le niveau total d'acides hydroxycinnamiques augmente dans le moût avec le retard de la date de récolte (Pérez-Magariño et González-San José, 2006, Tian *et al.*, 2009).

I.11.1.4. Les pratiques agricoles

Parmi les pratiques agricoles l'effet de l'effeuillage est particulièrement notable surtout lorsque ce dernier est pratiqué de telle sorte que les grappes soient plus longuement ou plus largement exposées au rayonnement solaire (modalité effeuillage au stade nouaison sur une seule face du rang NSF ou au stade véraison sur les deux faces VDF). La modalité VDF a donné un vin dont la teneur en acide *p*-coumarique est de 45 % supérieure à celle du vin issu de la modalité témoin (Davaux et Renard, 2001).

I.11.1.5. L'infection de la vigne

Les polyphénols, en particulier les acides phénols sont directement impliqués dans la réponse des plantes aux différents types de stress : ils contribuent à la guérison par la lignification des zones endommagées. Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes et leurs teneurs peuvent augmenter après l'infection (Kondakova *et al.*, 2009).

I.11.1.6. Les paramètres d'extraction des composés phénoliques

a- La température

Plusieurs pratiques font appel à la chaleur pour assurer une meilleure extraction des composés phénoliques et de la couleur (macération pré-fermentaire à chaud, flash détente, et macération finale à chaud). En effet, il y a une plus grande extraction des précurseurs des phénols volatils dans les vins issus des techniques faisant appel à la chaleur (Vinci *et al.*, 2008).

b- Les enzymes d'extraction

Les enzymes non purifiées, utilisées pour augmenter l'extraction des composés phénoliques et des arômes au cours de la macération, possèdent une activité secondaire qui est l'activité cinnamoyl estérase. En hydrolysant les précurseurs d'acides phénols qui sont estérifiés par l'acide tartrique, le milieu est enrichi en acides phénols libres. Il est conseillé alors d'utiliser des enzymes purifiées portant la mention « FCE » (free cinnamoyl estérase) (Oxenham, 2007).

c- La macération carbonique

Elle a lieu avant la fermentation alcoolique et permet aux enzymes du raisin dans un métabolisme anaérobie et sous une atmosphère saturée en CO₂, la production d'une faible quantité d'éthanol. Cette macération favorise une extraction importante des composés phénoliques du moût, spécialement l'acide *p*-coumarique (Goldsworthy, 1993 ; Heatherbell *et al.*, 1997, Salameh, 2008).

L'agitation du milieu fermentaire et le prolongement de la durée de macération pelliculaire peuvent aussi augmenter la quantité d'acides phénols dans les moûts (Ho *et al.*, 1999), et la quantité d'acide *p*-coumarique dans un vin fermenté dans des tonneaux en chênes est supérieure à celle du vin fermenté dans des cuves en acier inoxydable (Sun *et al.*, 2007).

I.11.2. Concentrations de l'acide *p*-coumarique dans des vins issus de différentes origines géographiques

Le **Tableau 7** présente les différents teneurs en acide *p*-coumarique des vins issus de plusieurs origines. Les résultats sont donnés sous la forme (moyenne des mesures ± écart type) sauf pour les vins d'Italie et Carignano de Sardaigne où une seule mesure était faite).

Tableau 7. Teneur de l'acide *p*-coumarique dans des vins issus de différentes origines géographiques.

Origine	Vin	Teneur en acide <i>p</i> -coumarique (mg.L ⁻¹)	Référence
Italie (vins de Puglia)	Montepulciano/Troia 2000	0,9	Gambelli et Santorini, 2003
	Montepulciano 1999	3,6	
	Troia 1998	11,8	
	Montepulciano /troia 1998	7,6	
	Primitivo/Tarantino 1999	5,3	
	Montepulciano 1998	10,3	
	Vins de Molise	non détecté	
	Montepulciano 2000	3,7	
	Montepulciano /Aglianico 1999	7,9	
	Montepulciano /Aglianico 1998	9,5	
	Aglianico 1997	4,5	
Sardaigne	Cannonau	3,94 ± 2,65	Sanna et al., 2008
	Monica	5,47 ± 3,57	
	Carignano	5,99	
Hongrie	Cabernet Franc	9,2 ± 6,7	Avar et al., 2007
	Cabernet Sauvignon	4,6 ± 5,8	
	Cabernet Sauvignon/Franc	9,2 ± 7,2	
	Cuvée	7,4 ± 5,5	
	Kadarka	1,8 ± 2,3	
	Kékfrantos	9,5 ± 5,3	
	Kékoporto	3,5 ± 4,4	
	Merlot	7,1 ± 9	
	Pinot Noir	8,9 ± 8,7	
	Shiraz	8,3 ± 3,8	
	Zweigelt	8 ± 8,2	
Turquie	Merlot	2,05 ± 0,033	Ozkan et Baydar, 2006
	Carignan	2,13 ± 0,047	
	Syrah	1,21 ± 0,036	
	Pinot Noir	4,11 ± 0,04	
	Cabernet Sauvignon	4,21 ± 0,035	
Espagne	Vin 1	6,4 ± 0,1	Russo et al., 2008
	Vin 2	11,8 ± 0,2	
	Vin 3	11,6 ± 0,3	
Thaïlande et Chine	Shiraz (2003)	18,33 ± 0,27	
	Shiraz KIV (2004)	25,9 ± 0,51	
	Shiraz (ECI) (2004)	14,1 ± 5,06	
	Muscat (Chine) (2003)	1,72 ± 0,56	

Suite du Tableau 7	Vin	Teneur en acide <i>p</i> -coumarique (mg.L ⁻¹)
	Muscat (Chine) (2004)	3,1 ± 2,2
	Muscat (2004)	non détecté
	Zinfandel (2003)	3,19 ± 0,28
	Zinfandel (2004)	4,76 ± 1,16
	Barbera (2003)	0,91 ± 0,03
	Barbera (2004)	4,57 ± 0,13
	Blended (2002)	3,2 ± 1,92

I.11.3. Teneurs des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols dans les vins du monde

Les concentrations des 4-éthylphénols et 4-éthylguaiacols analysés dans des vins sélectionnés au hasard et provenant de la vallée de l'Okanagan (Canada) ont tous été en dessous des seuils de perception des arômes (environ 500 µg.L⁻¹ pour le 4-éthylphénol et 50 µg.L⁻¹ pour le 4-éthylguaiacol) et même inférieures aux valeurs rapportées précédemment dans la littérature pour d'autres régions viticoles à travers le monde. Environ 60 % des échantillons contenaient des concentrations de 4-éthylphénol inférieures à 30 µg.L⁻¹ (avec une limite de détection de la méthode de 10 µg.L⁻¹), sachant que tous les échantillons présentaient des niveaux de 4-éthylphénol inférieurs à 235 µg.L⁻¹. De même, environ 60 % des échantillons contenaient moins de 5 µg.L⁻¹ de 4-éthylguaiacol (avec une limite de détection de la méthode de 1 µg.L⁻¹), et tous les échantillons possédaient moins de 80 µg.L⁻¹ de ce même composé (Rayne et Eggers, 2007b).

En comparaison avec les concentrations signalées dans d'autres régions viticoles à travers le monde, les niveaux de 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol présents dans les vins rouges en barrique de l'Okanagan sont assez faibles, bien qu'il y ait des variations considérables dans les concentrations de ces deux composés rapportés dans la littérature. Chatonnet *et al.* (1992a) ont analysé 137 vins rouges et blancs de France, et ont constaté que les vins blancs contenaient en moyenne 3 µg.L⁻¹ de 4-éthylphénol (valeurs entre 0 et 28 µg.L⁻¹), alors que les vins rouges étaient plus riches et possédaient comme moyenne 440 µg.L⁻¹ (valeurs entre 1 à 6047 µg.L⁻¹).

Les travaux de Chatonnet *et al.* (1992a) ont également été parmi les premiers à suggérer un ratio de concentrations du 4-éthylphénol par rapport au 4-éthylguaiacol. Les auteurs indiquent que ce ratio est de 8:1 dans les vins « touchés par *Brettanomyces* » comme ils les ont appelés. Dans les vins boisés, ce rapport s'est montré similaire au rapport de concentration de l'acide *p*-coumarique et de l'acide férulique qui sont les précurseurs du 4-éthylphénol et du 4-éthylguaiacol, respectivement. Chatonnet *et al.* (1992a) ont également montré que, pour le même vin rouge, le

vieillessement dans un réservoir en acier inoxydable a donné une faible concentration de 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol (32 et 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivement), tandis que le vieillissement en fûts de chêne neufs ont augmenté ces valeurs jusqu'à 455 et 41 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivement, alors que les vieux fûts ont donné les niveaux les plus élevés (1211 et 74 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivement).

A l'époque, ces résultats ont conclu que le vieillissement en fût de chêne conduit à un plus grand risque de production de 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol par *Brettanomyces*, et que les fûts les plus âgés (même après le rasage) présentaient plus de problèmes que les nouveaux. Cependant, ces mêmes auteurs ont trouvé des cuves en inox avec des niveaux proches de 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de 4-éthylphénol, montrant que l'élevage en barrique n'est pas une obligation pour l'apparition de ces composés.

En outre, dans une étude sur les bouteilles des vins rouges d'origine australienne, Pollnitz *et al.* ont déclaré que la gamme de concentrations du 4-éthylphénol varie entre 385 et 680 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les vins en barriques et entre 2 et 2660 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les vins finis en bouteille (avec une moyenne de 795 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Pollnitz *et al.*, 2000a, 2000b). Les intervalles de concentrations du 4-éthylguaiacol étaient de 28 et 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les barriques et de 1 et 437 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (moyenne = 99 $\mu\text{g.L}^{-1}$) dans les bouteilles.

L'étude de Pollnitz n'a pas montré de différence dans les concentrations du 4-éthylphénol ou du 4-éthylguaiacol entre fûts de chêne d'origine américaine et française mais ils ont rapporté que les vins issus du cépage Cabernet Sauvignon étaient les vins qui présentaient des niveaux plus élevés de 4-éthylphénol (1250 $\mu\text{g.L}^{-1}$) en comparant avec des vins issus de Shiraz-Syrah (605 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ou même de Pinot Noir (338 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Depuis que cette étude a été publiée en 2000, des chercheurs de l'Australian Wine Research Institute (AWRI) ont continué à surveiller les niveaux de ces composés volatils dans les vins australiens. Dans une autre étude réalisée sur 303 vins issus de Cabernet Sauvignon et du mélange Cabernet Sauvignon-Merlot de millésimes variant entre 1996 à 2002, Henschke *et al.* (2004) ont constaté que les moyennes de concentrations des 4-éthylphénols dans les années 1996-2000 ne sont pas différentes (entre 864 et 1164 $\mu\text{g.L}^{-1}$), mais que ces concentrations ont diminué pour atteindre une moyenne de 490 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les millésimes 2001 et 2002. En outre, l'AWRI rapporte une même décroissance après l'année 2001 (Coulter *et al.*, 2003; Hayasaka *et al.*, 2005).

I.12. Conclusions

Après cette revue bibliographique, quelques points importants méritent d'être soulignés:

- *Brettanomyces* est une levure de contamination, le plus souvent retrouvée dans les vins rouges.
- La présence de *Brettanomyces* a été signalée dans plusieurs pays. L'étude de la biodiversité a permis de révéler des différences génétiques en fonction des origines géographiques. Au Liban, aucune étude n'a encore mis en évidence la présence de ce genre de levure. De plus, il n'existe pas de données concernant le niveau de contamination des vins, la teneur en acide *p*-coumarique et celle en 4-éthylphénol Dans ce pays.
- *Brettanomyces* est responsable du mécanisme de biosynthèse des éthylphénols qui fait intervenir successivement deux enzymes. La première, une cinnamate décarboxylase transforme les précurseurs naturels, les acides cinnamiques (*p*-coumarique et férulique) en dérivées vinyliques peu aromatiques (4-vinylphénol et 4-vinylguaiacol). La seconde, une vinylphénol réductase assure la réduction des dérivées vinyliques en dérivées éthyliques : 4-éthylphénol et 4-éthylguaiacol. Ces phénols volatils générés donnent des arômes désagréables entraînant l'altération des qualités organoleptiques du vin. Dans la littérature, les rendements de bioconversion varient d'une étude à l'autre. La nature des souches ou d'autres voies métaboliques impliquées pourraient en être la cause.
- Dans les conditions œnologiques, l'acide *p*-coumarique peut subir plusieurs voies de transformation ce qui empêche les auteurs d'évaluer la quantité réelle participant à la bioréaction. Ces problèmes d'évaluation pourraient aussi être liés aux problèmes analytiques de son dosage dans le vin et expliquer les rendements très différents mentionnés dans la littérature. La comparaison des cinétiques de bioconversion est rarement étudiée. Pourtant, les profils de disparition de l'acide et de l'apparition des 4-éthylphénols doivent permettre d'expliquer les différentes étapes constituant le mécanisme de conversion.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Dépistage des levures *Brettanomyces/Dekkera* dans les vins libanais

II.1.1. Collecte des échantillons

- Moûts et vins collectés en cuves et barriques

La majorité des cuves rencontrées sont en inox mais des cuves en plastique existent aussi. En général, toutes ces cuves disposent d'un robinet de soutirage, facilitant l'échantillonnage. Après une première coulée de vin (ou moût) permettant le rinçage, l'échantillon est prélevé dans un flacon en verre de contenance 200-250 mL, stérilisé auparavant par autoclavage (121°C, 20 min). Si l'échantillonnage se fait à partir d'une barrique, une canne aspirante en verre sert au prélèvement. Cette canne est nettoyée par un premier volume de vin à échantillonner. Le prélèvement est alors effectué lors d'une deuxième remontée de vin directement recueilli dans un flacon stérile.

- Vins embouteillés

Le nombre de bouteilles de vin testé a été plus faible que le nombre d'échantillons collectés en cuves et barriques. En effet, le vin en bouteille est moins susceptible d'être contaminé car il est souvent filtré afin d'éliminer tous les microorganismes avant l'embouteillage.

Pour le dépistage microbiologique, un petit volume est prélevé à l'aide d'une pipette stérile, après homogénéisation de la bouteille.

II.1.2. Les vins étudiés

Afin que notre étude soit la plus globale possible, 100 échantillons variés appartenant à différents millésimes, issus de différents cépages et de différents domaines libanais ont été choisis. Ces échantillons sont présentés dans le **Tableau 14** du **Chapitre III** p. 81.

II.1.3. Nature des milieux nécessaires au dépistage de *Brettanomyces/Dekkera*

II.1.3.1. Milieux GCA et ECA

Le milieu de culture GCA (Gélose au Chloramphénicol et à l'Actidione) a été formulé par Medawar (2003) sur les critères de sélectivité suivant:

- Emploi du chloramphénicol qui est un antibactérien à large spectre permettant de prévenir le développement des bactéries acétiques, lactiques et autres sans pour autant présenter une action fongistatique qui pourrait gêner le développement de *Brettanomyces*.
- Emploi d'actidione pour lequel la résistance des levures *Brettanomyces* est avérée contrairement au genre *Saccharomyces* inhibé par cet antifongique.

La culture sur milieu GCA ne permet pas de détecter les cellules présentes en faible quantité dans le milieu étudié, une phase d'enrichissement sur milieu liquide ECA (Enrichissement au Chloramphénicol et à l'Actidione) (Medawar, 2003) est alors nécessaire pour les récupérer ou les réactiver. La composition des milieux est présentée dans le **Tableau** suivant :

Tableau 8. Composition des milieux GCA et ECA.

Composition du milieu (g.L ⁻¹)	Nature du milieu	
	GCA	ECA
Agar	15	
Glucose	10	15
Extrait de levure	3	4
Peptone papainique de soja	3	4
AUTOCLAVE 121°C, 20 min		
Chloramphénicol	0,3	0,4
Actidione (cycloheximide)	0,2	0,2

Sachant que l'actidione n'est pas stable en solution acide, il a été dissous à 15 g.L⁻¹ dans l'eau distillée alors que le chloramphénicol étant difficilement soluble dans l'eau, il a été dissous à 15 g.L⁻¹ dans une solution (50 v eau/50 v éthanol absolu). Les solutions ont été filtrées à 0,45 µm avant d'être ajoutées aux milieux après autoclavage.

II.1.3.2. Milieu solide Bi-Test (MSBT)

Le Bi-Test, dont la composition est présentée dans le **Tableau 9**, permet d'évaluer le caractère acidifiant des colonies présentes. L'acidification est mise en évidence par l'apparition d'un halo translucide autour des colonies produisant de l'acide. Ce halo translucide ressemble à un miroir où le gel se décolore, à cause de la dissociation du calcium, suivant la réaction :



Le CaCO_3 qui est insoluble forme une suspension trouble alors que le Ca^{2+} qui est parfaitement soluble donne un gel clair (Barbin, 2006).

Tableau 9. Composition du milieu MSBT.

Composition du milieu (g.L ⁻¹)	Milieu solide BiTest (MSBT)
Agar	20
Glucose	10
Extrait de levures	5
Acide <i>trans-p</i> -coumarique	0,05
CaCO ₃	3,5
AUTOCLAVE 121°C, 20 min	
Chloramphénicol	0,1
Actidione	0,1

II.1.4. Procédure de dépistage

II.1.4.1. Culture sur milieu GCA

Ce milieu gélosé forme la première étape de notre procédure. L'observation microscopique des colonies isolées sur milieu GCA montre une spécificité partielle en raison du développement de microorganismes de morphologie différente de celle du type *Brettanomyces sp.* .

L'objectif de cette étape était de juger du développement levurien et de faire un tri entre les échantillons négatifs (aucun microorganisme visible) et les échantillons positifs probables (présence d'une microflore, avec soupçon de morphologie type *Brettanomyces*) ou positifs (morphologies typiques). Ce milieu présente aussi l'avantage de juger du degré de contamination de l'échantillon testé. En effet, si des colonies apparaissent sans aucune phase d'enrichissement, l'échantillon est considéré comme moyennement ou hautement contaminé.

II.1.4.2. Phase d'enrichissement sur milieu ECA

La culture d'enrichissement sur le milieu liquide ECA permet d'éviter les faux négatifs et s'avère nécessaire pour détecter les faibles concentrations cellulaires ou encore réactiver les cellules stressées par de longs séjours dans les anciennes bouteilles de vins. Ces derniers pourraient révéler soit un exemple de l'état des levures VBNC, soit un enrichissement en raison de très faibles quantités de microorganismes présents dans l'échantillon à tester. Cependant, il est

faiblement probable que ce soit l'état VBNC puisqu'il s'agit, par définition, de cellules qui ne sont pas cultivables, même sur des milieux non sélectifs. Une fois la culture enrichie sur ECA, le milieu GCA est utilisé pour l'obtention de colonies.

II.1.4.3. Discrimination par la morphologie

Même si le critère morphologique n'est pas en soit discriminatoire du fait du polymorphisme du genre *Dekkera/Brettanomyces sp.*, l'observation au microscope des microorganismes qui se développent sur gélose (milieu GCA) permet un premier tri (**Figure 6**).

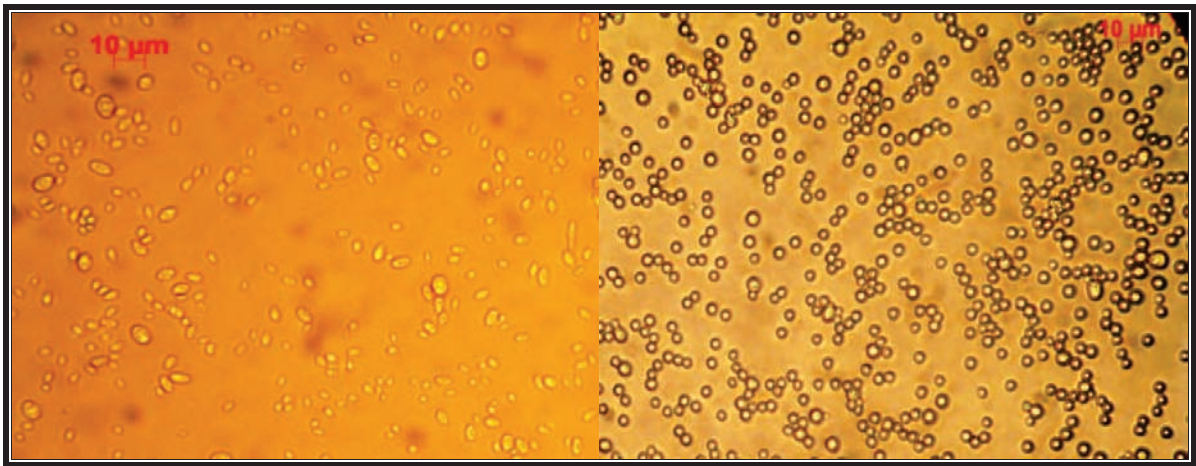


Figure 6. Distinction microscopique des levures isolées sur gélose GCA.

A gauche des levures pyriformes, multi bourgeonnantes avec disparité de tailles apparaissent rappelant la morphologie typique de *Brettanomyces sp.* A droite, des microorganismes, résistantes au chloramphénicol, présentent une forme arrondie et d'aspect plus brillant éliminant ainsi la présence du type *Brettanomyces sp.* dans les échantillons. Toutefois, cette étape reste préliminaire et le résultat définitif est à confirmer par un Bi-Test.

II.1.4.4. Discrimination par le caractère acidifiant : test sur milieu MSBT

Le test sur milieu MSBT (Barbin, 2006, Barnett *et al.*, 1990), contenant du CaCO_3 , permet de vérifier le pouvoir acidifiant des colonies formées, sachant que, parmi toutes les levures du vin résistantes à l'actidione, ce pouvoir caractérise seules les *Brettanomyces sp.* Les colonies développées sur milieu MSBT sont toujours de petites colonies, blanches, lisses et crémeuses. Le

caractère acidifiant est mis en évidence par l'apparition d'un halo translucide autour des colonies produisant de l'acide (**Figure 7**).

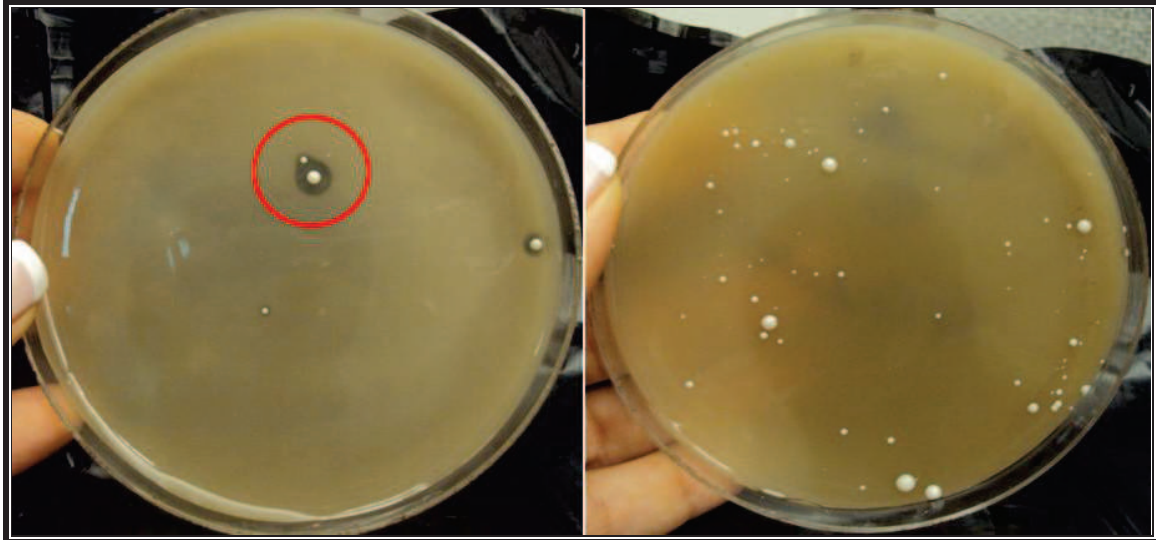


Figure 7. Distinction sur milieu MSBT entre les levures à caractère acidifiant à gauche (présence d'un halo translucide entourant les colonies) et les levures non productrices d'acide à droite.

II.1.4.5. Discrimination par la technique du « sniffing »

La présence d'acide *p*-coumarique dans le milieu gélosé MSBT permet de juger s'il y a production de 4-éthylphénols par les microorganismes présents. Les isolats de *Brettanomyces* doivent être capables de convertir l'acide *p*-coumarique présent dans le milieu. La présence des molécules 4-éthylphénols est détectée par appréciation de l'odeur phénolée à caractère désagréable (« sniffing ») rappelant l'odeur des chevaux.

II.1.4.6. Schéma récapitulatif de la procédure de dépistage

La procédure de dépistage et d'isolement des levures *Brettanomyces* dans les différents échantillons de vins est résumée dans la **Figure 8** :

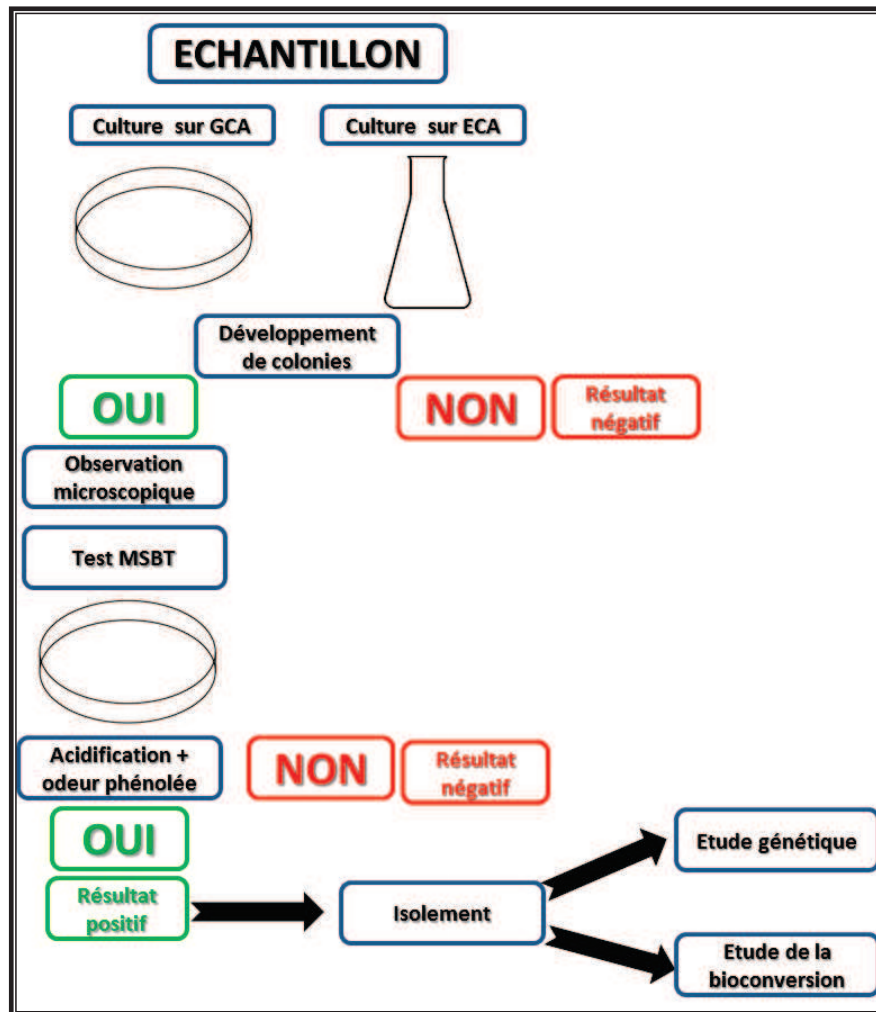


Figure 8. Schéma récapitulatif des différentes étapes successives de la procédure de dépistage.

II.2. Caractérisation génétique des souches de *Brettanomyces* isolées

Que ce soit pour étudier l'écologie microbienne, pour contrôler les fermentations, prévenir ou expliquer les altérations, contrôler l'hygiène des matériels, détecter et caractériser les microorganismes restent des étapes primordiales à exécuter.

Notre approche expérimentale fut dans un premier de temps de vérifier que les différents isolats appartenaient à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* par amplification d'un fragment de l'ADNr 26S (Phister et Mills, 2003) et dans un deuxième temps, de distinguer les différents isolats par étude de leur phylogénie par :

- Une amplification par PCR des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) (Figure 9)
- La digestion des amplicons obtenus par différentes enzymes de restriction (RFLP)

- Le séquençage génétique des amplicons.

Pour entamer cette approche, 3 isolats issus des vins libanais et 2 autres isolées de vins espagnols qui ont déjà été caractérisées en France comme appartenant au genre *Brettanomyces* furent notre matériel d'étude.

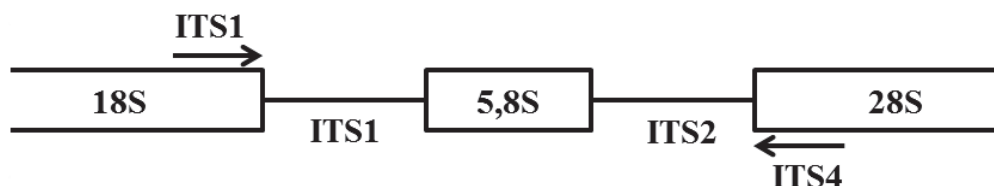


Figure 9. Emplacement de l'amorce amont ITS1 et de l'amorce aval ITS4 délimitant la région ITS à amplifier par PCR pour étude phylogénétique.

II.2.1. Culture des souches

Les levures sont mises en culture dans un milieu Prévain (cf. composition **Tableau 9**) pendant au moins 48 h à 30°C et sous agitation continue.

II.2.2. Extraction de l'ADN

Le culot de levures est obtenu après centrifugation de 10 mL de culture (10 min, 8500 rpm). Ce culot est ensuite suspendu dans 200 µL de tampon de lyse [2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)] puis soumis à 2 cycles de congélation (-80°C)/ décongélation (+95°C) afin de casser les parois de levures et libérer l'ADN. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté à la suspension et la lyse des cellules se fait par homogénéisation vigoureuse. Le mélange est ensuite centrifugé (4 min, 13000 rpm) à température ambiante. Cette étape permet la séparation des acides nucléiques des protéines qui forment donc une galette protéique à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. Les ADNs contenus dans la phase aqueuse récupérée sont précipités avec 400 µL d'éthanol absolu glacé puis centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min. Après lavage à l'éthanol 70 % glacé, le culot d'ADN obtenu est séché dans un bain-marie à sec (55-60°C) pendant 15 min puis suspendu dans un volume de 100 µL de tampon TE [10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8)]. A pH 8, la dégradation de l'ADN est notablement plus faible qu'à pH 7. L'EDTA permet de chélater les ions divalents (nécessaires pour les nucléases) et évite la croissance de microorganismes. Pour améliorer la qualité de l'ADN, une étape ultérieure de traitement d'ARNase a été effectuée selon

la procédure décrite par Hoffman et Winston (1987) ou par mélange phénol: chloroforme (1v: 1v) afin de se débarrasser de tous les débris protéiques restants. L'ADN est enfin conservé à une température de -20°C.

II.2.3. Vérification quantitative et qualitative de l'ADN extrait par dosage spectrophotométrique

L'absorption de la solution finale obtenue est mesurée aux longueurs d'onde 260 et 280 nm. L'ADN a une absorbance maximale à une densité optique (DO) de 260 nm. Cela permet de calculer la concentration des ADN sachant qu'une unité DO à 260 nm correspond à une solution d'ADN double brin de 50 µg.mL⁻¹.

Un rapport de DO 260/DO 280 égal à 1,7 indique qu'il n'y a pas une contamination en protéines. Sinon un traitement phénolchloroforme (v/v) suffit pour éliminer cette contamination en protéines. Le rapport DO 260/DO 280 supérieur à 2 indique une contamination par l'ARN. Dans ce cas, un traitement à la RNase permet de se débarrasser de l'ARN contaminant.

II.2.4. Amplification de l'ADN par PCR (réaction en chaîne par polymérase)

Dans le but d'amplifier des fragments d'ADN de 79 pb et de 500 pb respectivement, 50 ng d'ADN génomique extrait de différentes souches de *Brettanomyces* sont amplifiés en présence de 15 pmol d'amorces des couples DBRUXF (5'-GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC-3')/DBRUXR (5'-GAAGGGCCACATTCACGAACCCCG -3') (gène codant la sous-unité ribosomique 26S) et ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Internal Transcribed Spacer) par 0.25 U de Taq polymérase (Fermentas) selon le programme schématisé dans le **Tableau 10** :

Tableau 10. Programme d'amplification par PCR. Les procédures de réalisation de la PCR sont identiques à celles décrites par Guillámon *et al.* (1998) pour les amorces ITS1 et ITS4 alors que pour les amorces DBRUXF et DBRUXR, les paramètres des cycles thermiques de Phister et Mills (2003) ont été légèrement modifiés.

étapes	amorces	
	DBRUXF/DBRUXR	ITS1/ITS4
1 dénaturation	95°C, 3 min	95°C, 5 min
2 (35 cycles)	dénaturation	95°C, 30 s
	hybridation	55°C, 45 s
	élongation	72°C, 30 s
	3 extra-élongation	72°C, 5 min
4	4°C	4°C

La taille des fragments amplifiés est vérifiée par séparation des produits de PCR correspondants sur un gel d'agarose (1,5 à 3 %) dilué avec du TAE 1X (tris-acétate EDTA) et coloré au bromure d'éthidium.

II.2.5. Purification des produits de PCR

Avant de procéder à la digestion enzymatique, les produits de PCR obtenus avec les amorces ITS1 et ITS4 ont été purifiées sur colonnes «ROCHE» selon les recommandations du fournisseur.

II.2.6. Hydrolyse enzymatique de l'ADN purifié et analyse par RFLP

La technique de PCR-RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) est le résultat de la combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à nombre élevé de sites de coupure et d'une électrophorèse simple.

Dans notre étude, les produits de PCR purifiés ont été hydrolysés avec chacune des 3 enzymes de restriction *Cfo I*, *Hae III* et *Hinf I* selon les recommandations du fournisseur «ROCHE». Les enzymes de restriction représentent des désoxyribonucléases bactériennes qui reconnaissent et coupent des séquences de bases palindromiques plus ou moins longues (4 à 6 pb) sur les 2 brins de l'ADN. Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un site spécifique (**Tableau 11**).

Les fragments de restriction apparaissent après électrophorèse sur gel d'agarose (2 %) coloré au bromure d'éthidium et révélé par un système de transillumination UV.

Tableau 11. Description des sites de coupure des 3 enzymes de restriction choisies pour cette étude.

enzyme de restriction	sites de coupures
<i>Hinf I</i>	G'ANTC
<i>Hae III</i>	GG'CC
<i>Cfo I</i>	G'CGC

II.2.7. Séquençage génétique

II.2.7.1. Réaction de PCR précédant le séquençage automatisé de l'ADN

Pour cette réaction, 1 μL de l'ADN génomique dilué à une concentration de $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a été ajouté à un mélange de réaction de volume 10 μL contenant les réactifs suivants ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de « Finnzymes », [Phusion high-fidelity DNA polymarase c.à.d une Taq fidèle], 2 μL de chaque amorce à une concentration de 50 μM et 5 μL de H_2O).

Les réactions successives de PCR ont été effectuées sur un thermocycleur [BioRad (IQTM5)] programmé comme suit: une température de dénaturation initiale de 98°C pendant 1 min suivie de 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 1 s, un annealing à 50°C pendant 15 s et une extension à 72°C pour 45 s. La polymérisation a été achevée en 1 min d'incubation à 72°C .

II.2.7.2. Séquençage et analyse phylogénétique

Le séquençage des produits de PCR purifiés de l'ADN génomique a été réalisée par « l'Unité Génétique médicale de la Faculté de médecine de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, Liban ».

Le séquenceur est un Big Dye Terminator v3,1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). ChromasPro 1,34 a été utilisé pour l'analyse des séquences obtenues.

L'alignement de séquences des fragments PCR a été effectué manuellement à l'aide du logiciel « ChromasPro » tandis que l'analyse du polymorphisme nucléotidique et le dendrogramme basé sur la similarité de séquence ont été réalisés avec Clustal W (version 1,83).

II.3. Déroulement des fermentations

II.3.1. Nature des souches et des milieux de fermentation

II.3.1.1. Souches de levures

Cinq isolats ont été utilisés dans cette étude pour le suivi cinétique des fermentations. Trois proviennent de la campagne d'isolement réalisée au Liban (cf. **Chapitre III**). Les deux autres sont des souches de *Brettanomyces* disponibles au Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse qui ont été isolées sur du moût de vins espagnols en 2008 après fermentation alcoolique avec la technique du moût sélectif (actidione, éthanol), puis par sniffing. Ces deux dernières souches seront nommées F1 et F2 dans la suite de ce mémoire.

II.3.1.2. Milieux de culture

Tableau 12. Composition des milieux de culture utilisés pour les expériences de fermentation avec les différentes souches de *Brettanomyces*.

Composition du milieu (g.L ⁻¹)	Nature du milieu de culture			
	Conservation	Prélevain (P)	Levain (L)	Milieu Synthétique Vin (MSV) ou (F)
Agar-Agar	20			
Fructose				10
Glucose	20	20	20	10
Extrait de levures	10	1	1	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄		2	2	0,5
Acide Citrique		0,3	0,3	0,3
Acide Malique		3	3	3
Acide Tartrique		2	2	2
MgSO ₄		0,4	0,4	0,4
KH ₂ PO ₄		5	5	5
Glycérol			3	6
		Ajustement du pH à 3,5		
		AUTOCLAVE 121°C, 20 min		
Ethanol			30 (4% v/v)	75 (10% v/v)

a- Milieu de Conservation

La conservation des souches se fait sur gélose inclinée ou sur des boîtes de pétri à 4°C. Ces milieux gélosés sont stérilisés à 120°C pendant 20 min.

Un repiquage à intervalles réguliers de 3 mois est effectué pour les boîtes de pétri et de 6 mois pour les tubes. L'incubation se fait ensuite à 30°C pour une durée d'au moins 72 h.

Pour le stockage à long terme, les souches ont été conservées dans un milieu de culture (P) à 20 % de glycérol. Dans ce cas, le stockage se fait à -80°C.

b- Milieux (P), (L) et (MSV)

Les milieux sont préparés dans des flacons qui seront bouchés avec du coton, enroulés de papier aluminium, pour être ensuite stérilisés à 120°C pendant 20 minutes. Le pH est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution de NaOH 10 M ou si nécessaire à l'aide de l'acide ortho-phosphorique à 85 % avant autoclavage.

Pour les milieux (L) et (MSV), l'éthanol est ajouté stérilement après autoclavage.

La composition des 4 milieux est décrite dans le **Tableau 12**.

c- Milieu Tampon Phosphate-Citrate

Le rôle d'une solution tampon est de permettre de limiter les variations de pH qui sont souvent dû à l'acidité ou l'alcalinité des composés produits ou consommés en cours de fermentation.

Dans le but d'étudier l'influence du pH et du niveau de population sur la cinétique de bioconversion de l'acide *p*-coumarique en éthylphénols, des milieux tampons dont la composition est décrite dans le **Tableau 13** ont été utilisés pour la mise en suspension stérile des levures en début de phase stationnaire. L'acide *p*-coumarique est directement ajouté aux milieux tampons.

Dans ces conditions, les levures sont en état physiologique stable ce qui permet de suivre la réaction sans que ce paramètre ne vienne perturber l'analyse.

Le milieu tampon est préparé à partir d'une solution A d'acide citrique à une concentration de 0,50 M (soit 105,06 g de C₆H₇O₈, H₂O par litre) et d'une solution P de phosphate de sodium disodique à 0,50 M (soit 71,01 g de Na₂HPO₄ par litre).

Ces 2 solutions sont mélangées suivant les proportions indiquées dans le **Tableau 13** et diluées à 200 mL avec de l'eau distillée.

Tableau 13. Composition des milieux tampons phosphate-citrate.

pH	solution A (mL)	solution P (mL)
2,6	35,64	8,72
3	31,78	16,44
3,4	28,6	22,8
4	24,58	30,84

II.3.2. Suivi des expériences de Fermentation

Les fermentations alcooliques menées avec les différentes souches de *Brettanomyces* se font en trois étapes. Pour commencer le processus, il suffit de prendre stérilement quelques colonies du milieu de conservation et de les inoculer dans le prélevain (P). Cette étape permet d'habituer la souche au milieu. La deuxième étape consiste à ensemercer le levain (L) avec $3 \cdot 10^6$ levures.mL⁻¹, prélevées en phase de croissance exponentielle ce qui correspond à environ 35 h après ensemençement. Ces deux étapes permettent la réactivation des souches dans deux milieux liquides précédant la fermentation. Ainsi, après 35 h dans le milieu L (pour être toujours en phase de croissance), la fermentation dans le milieu P débute par l'ensemencement avec $3 \cdot 10^6$ levures.mL⁻¹. Ce temps est alors considéré comme le t_0 initial de chaque fermentation (**Figure 10**).

Les milieux (P), (L) et (F) sont tous préparés dans des flacons de 500 mL de volume contenant 300 mL de milieu nécessaire à chaque étude. Chaque série d'expériences est réalisée en triplicats (**Figure 11**) dans un bain marie à 30°C et sous agitation à 250 rpm.

II.3.2.1. Ajout de l'acide *trans-p*-coumarique au milieu de fermentation

L'acide *trans-p*-coumarique est pesé sur une microbalance analytique puis dissous dans 1 mL d'éthanol absolu. La solution est filtrée sur une membrane stérile de 0,45 µm, puis ajoutée au milieu. Pour l'étude de la bioconversion, toujours afin de s'affranchir des variations liées à la croissance, l'ajout de l'acide se fait en début de phase stationnaire.

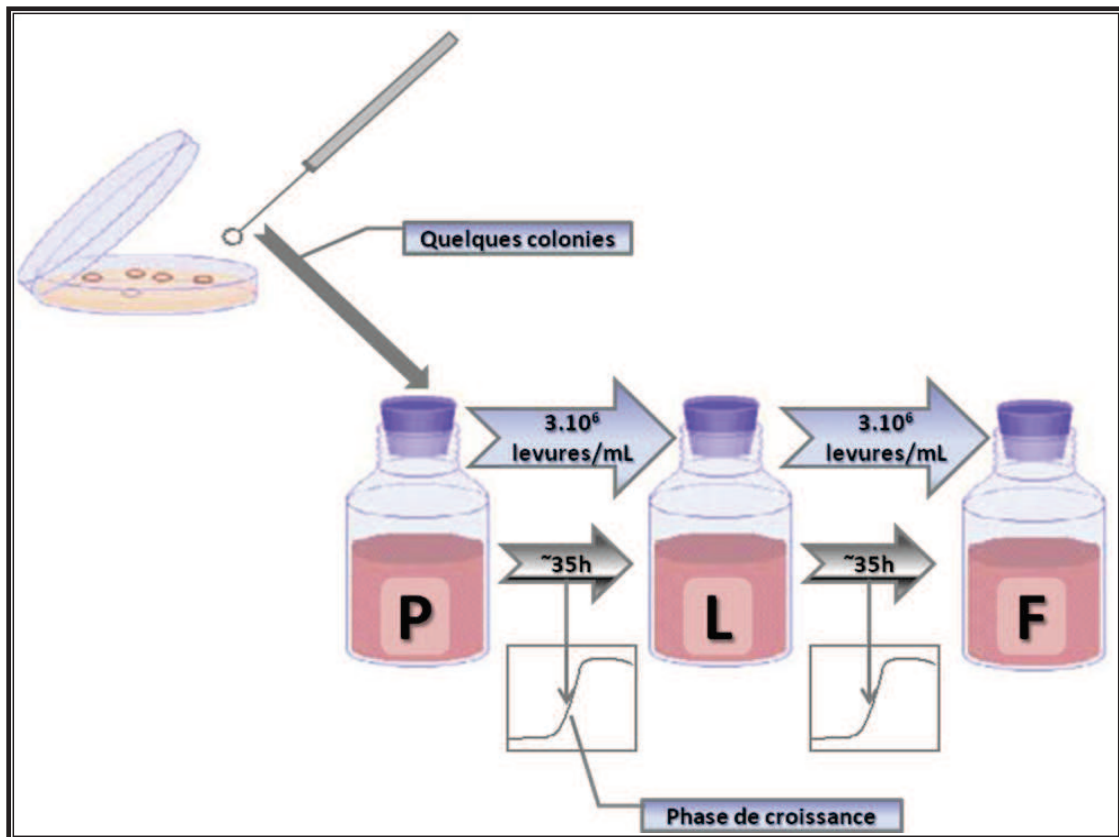


Figure 10. Schématisation de la préparation de l'inoculum en deux étapes successives précédant la fermentation.



Figure 11. Etude de la fermentation en 3 exemplaires.

II.3.2.2. Prise des échantillons pour l'étude de la réaction de bioconversion

Avant l'ajout de l'acide *trans-p*-coumarique, des prélèvements de 2 mL suffisaient pour analyser la biomasse.

Une fois que la bioconversion débute, des prélèvements stériles de 7 mL sont nécessaires pour faire les analyses. Le protocole est présenté sur la **Figure 12** :

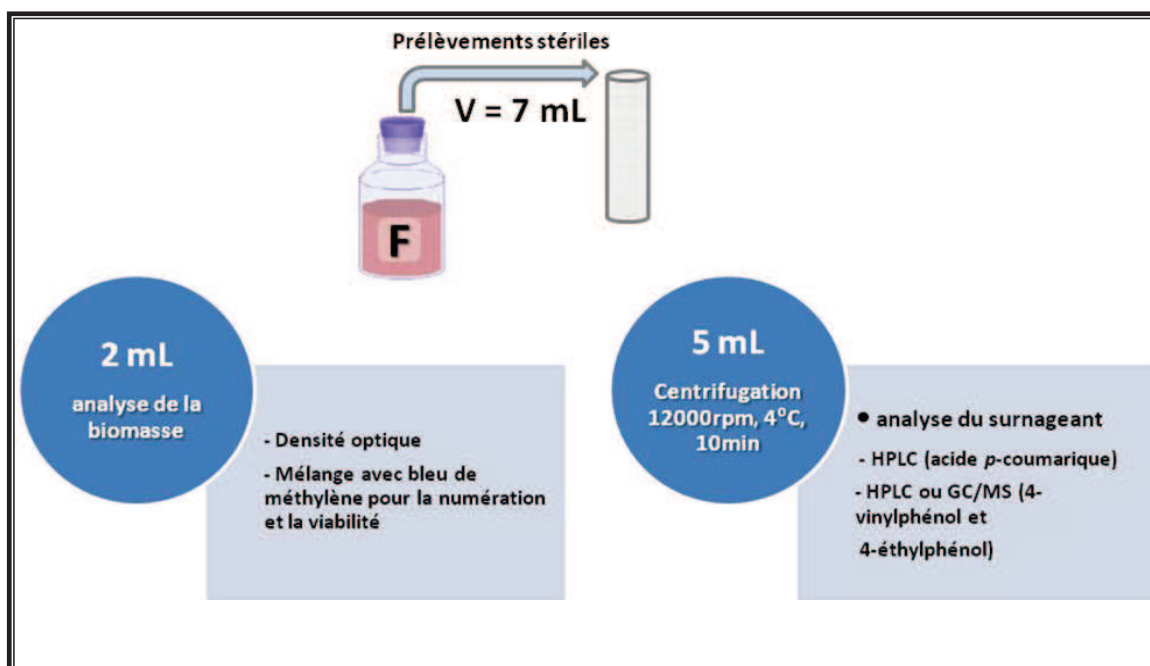


Figure 12. Schéma représentatif de la démarche d'analyse.

II.4. Protocole opératoire pour tester l'influence du nombre de *Brettanomyces* dans un vin sur la vitesse d'apparition du 4-éthylphénol

Cinq souches de levures différentes ont été testées. Les levures ont dans un premier temps été cultivées jusqu'à atteindre le début de phase stationnaire, temps où la concentration cellulaire ne doit plus évoluer en fonction du temps. La composition des différents milieux nécessaires à la réactivation des levures avant le début du test et la composition des milieux de culture utilisés pour les expériences de fermentation avec les différentes souches de *Brettanomyces* sont identiques à ceux décrits précédemment (**Tableau 12**).

Des dilutions stériles sont alors faites dans un milieu synthétique vin (cf. composition **Tableau 12**) afin d'obtenir un nombre de cellules défini (de 1 à 100000) qui sera ajouté directement à 20 mL de vin. Nous avons utilisé un vin rouge (Pays d'Hérault, IGP) ayant un degré alcoolique de 12 %.

Pour chaque souche, 6 dilutions de concentration en levures sont faites. Le volume de vin est alors filtré stérilement sur un filtre d'acétate de cellulose de diamètre 4 cm et de porosité 0,45 μm . Ensuite, le filtre est immergé dans un erlenmeyer stérile (de 250 mL) contenant 20 mL d'un milieu nommé MYPG. Ce milieu de culture liquide spécifique de *B. bruxellensis* est mis au point par la société BIOSENTEC. Il est composé en fonction de plusieurs critères de sélectivité. Sa composition reste confidentielle.

Les erlenmeyers sont bouchés avec du coton et du papier Alu et placés dans une étuve à 28°C. La **Figure 13** résume la procédure opératoire.

Un prélèvement de 1,5 mL est réalisé 1 fois par jour pendant 6 jours. Des comptages sont réalisés et le volume prélevé est centrifugé dans des eppendorfs de 2 mL. Le surnageant est stocké à -20°C dans des vials d'HPLC en verre.

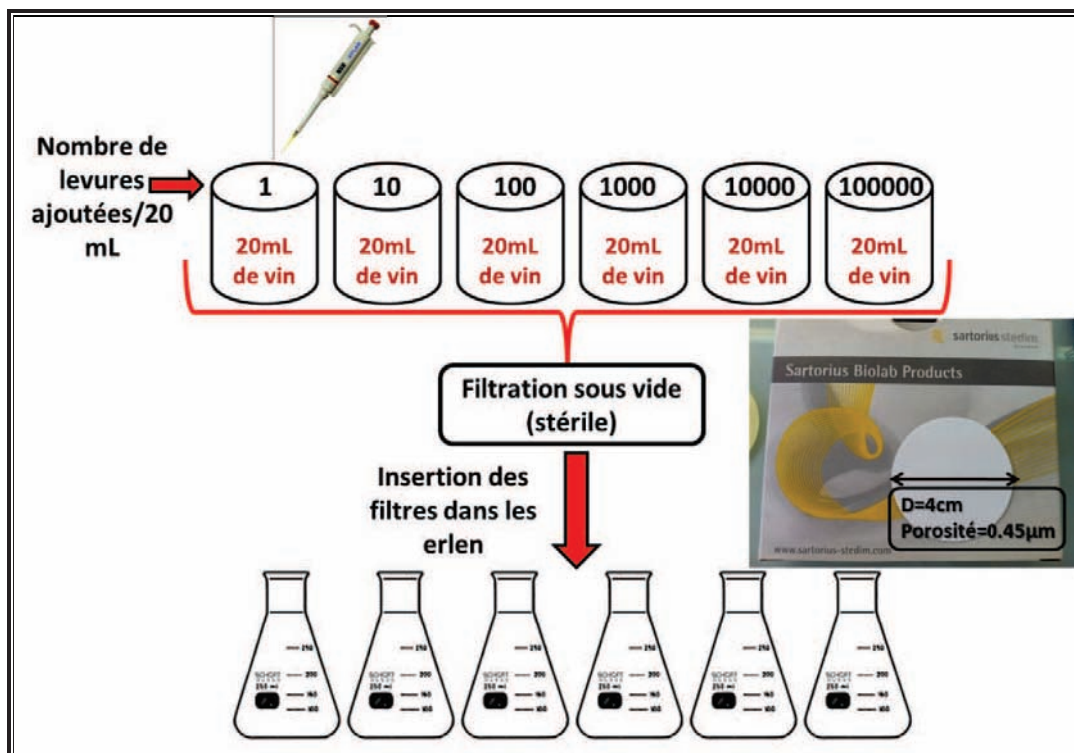


Figure 13. Démarche opératoire.

II.5. Techniques analytiques et méthodes de mesures directes

II.5.1. Analyse de la biomasse

Dans cette étude, la numération sur cellule de THOMA (informations sur le nombre et la physiologie générale des cellules) et la DO (méthode rapide) ont été utilisées pour mesurer la biomasse.

a- Evaluation de la biomasse par turbidimétrie

Elle est déterminée grâce à un système optique, en général un spectrophotomètre, qui mesure la diminution due à l'absorbance de l'intensité d'un rayon lumineux traversant la suspension.

La turbidimétrie est utilisée afin de déterminer la numération cellulaire totale, (aussi bien des levures mortes que vivantes). La diffusion de la lumière du faisceau incident, (de longueur d'onde $\lambda=620$ nm), par les levures du milieu est négligée. C'est pourquoi en général cette mesure est considérée comme une simple mesure d'absorbance (bien qu'en réalité il s'agisse d'une mesure du degré de turbidité de la suspension).

Les mesures de la DO ont été réalisées dans des cuves en verre de 2 mm de trajet optique. Pour obtenir une corrélation linéaire entre la DO et la concentration cellulaire, il faut diluer la suspension pour rester dans une gamme de DO comprise entre 0,1 et 0,8.

b- Numération totale de la population sur cellule de THOMA

La cellule de THOMA est une cellule de numération, de volume total $0,1 \text{ mm}^3$, utilisée sous microscope ayant un objectif 40. Son quadrillage est formé de 16 grands carrés, composés chacun de 16 petits carrés.

Les levures se dispersent aléatoirement dans le quadrillage où il faut choisir 5 grands carrés pour compter les cellules (**Figure 14**). Des dilutions du prélèvement doivent être faites pour rester toujours dans la zone de comptage (130-250 levures) afin de minimiser l'erreur. Dans les cas où les concentrations cellulaires sont faibles, il est possible de compter sur l'ensemble des 16 carrés.

Pour le comptage de levures bourgeonnantes, une levure fille compte comme une levure uniquement si sa taille est supérieure ou égale à 50% de la taille de la levure mère.

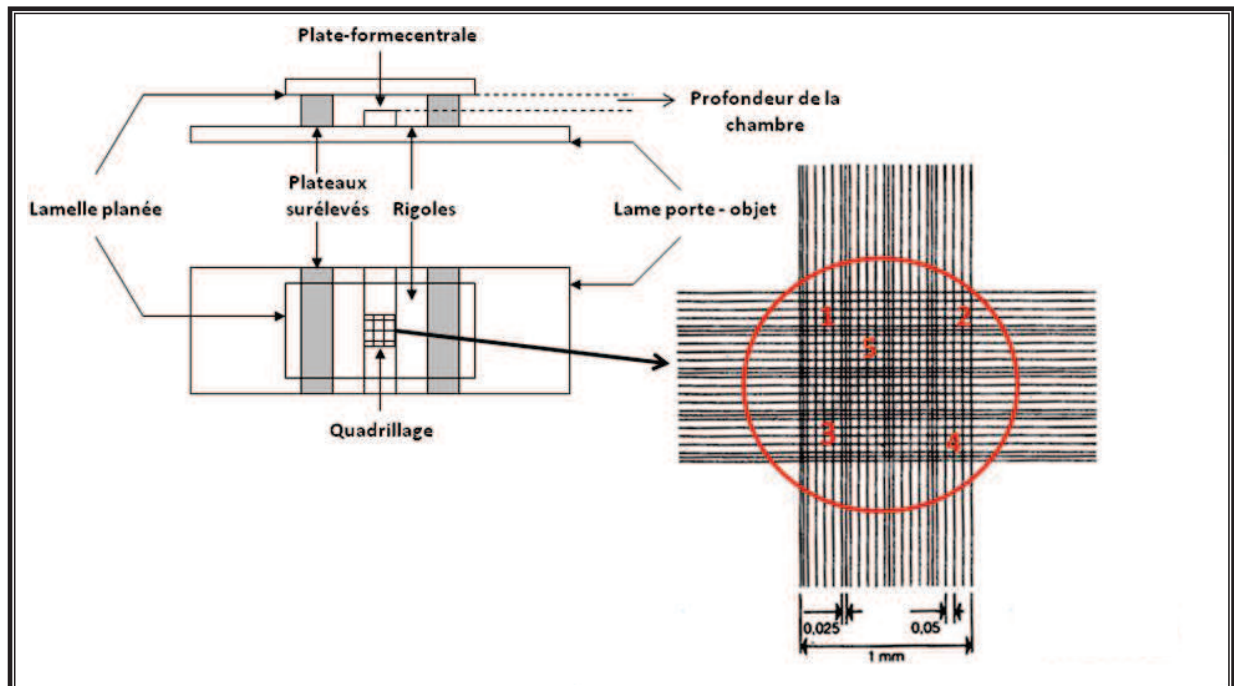


Figure 14. Schématisation de la cellule hématimètre de THOMA.

c- Estimation de la viabilité cellulaire par coloration au bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (ou chlorure de méthylthionium) est un composé organique, dont la formule chimique est bis-(diméthylamino)- 3,7 phenazathionium chlorure. Il n'interagit pas avec la membrane si cette dernière est intacte. Il ne va donc colorer que les cellules endommagées, permettant de déterminer la viabilité d'un échantillon, viabilité définie donc comme cellules ayant conservé leur intégrité membranaire.

Les échantillons sont dilués puis mis en contact volume à volume avec le bleu de méthylène : 0,1 g de bleu de méthylène dissous dans 1 L d'une solution de citrate de sodium à 2 % (poids/volume). Les cellules mortes sont colorées en bleu foncé alors que les cellules vivantes restent incolores ou parfois légèrement colorées en bleu clair (Barbin, 2006).

Le pourcentage de mortalité (% M) est défini par :

$$\% M = \frac{\text{nombre de cellules mortes}}{\text{nombre de cellules totales}} \times 100$$

Ensuite, la biomasse qui participe à la fermentation sera traduite en nombre de [levures actives.ml⁻¹] par la relation suivante :

$$[\text{biomasse}]_{\text{levures.ml}^{-1}} = \frac{(\text{nombre de levures totales} - \text{nombre de levures mortes})}{\text{nombre de grands carrés}} \times \text{facteur de dilution} \times 250\,000$$

II.5.2. Dosage de l'acide *p*-coumarique

II.5.2.1. Chromatographie : système et appareillage

La chromatographie en phase liquide (système « Thermo Separation High performance Liquid Chromatography ») couplée à une détection UV décrite par Salameh (2008) a été utilisée pour doser l'acide *p*-coumarique dans les différents échantillons de vins ainsi que dans les échantillons prélevés des milieux de fermentation lors de l'étude de la consommation de l'acide.

Les mesures sont faites à deux longueurs d'ondes différentes (284 et 305 nm). Une colonne ODS-2 5 μ (Waters) (4,6×250 mm) munie d'une précolonne Spherimage ODS-2 permet la séparation. Le logiciel « Chromgate » est utilisé pour l'acquisition des données ainsi que pour l'analyse et l'intégration des pics.

II.5.2.2. Préparation des échantillons et conditions opératoires

Un volume correspondant à 1 mL de chaque échantillon (vin ou surnageant de fermentation) est prélevé puis filtré sur une membrane stérile de 0,45 μm de diamètre de pores avant d'être directement mis dans des tubes de 1,5 mL de volume total.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- ✓ Composition de la phase mobile : eau ultra pure 77 %, acétonitrile 23 %.
- ✓ pH de la phase mobile 3,5 (ajusté avec 0,12 g.L⁻¹ d'acide formique).
- ✓ Débit de la pompe 0,7 mL.min⁻¹.
- ✓ Température 30°C.

II.5.2.3. Détection et quantification

La quantification des pics effectuée dans une zone de linéarité située entre 0,5 et 10 mg.L⁻¹ est basée sur la variation des aires des pics détectés en fonction de la concentration par rapport à des droites d'étalonnage. Tous les échantillons ayant des concentrations supérieures à 10 mg.L⁻¹ ont subi des dilutions afin de respecter le domaine de linéarité.

II.5.2.4. Droites d'étalonnage pour le dosage de l'acide *p*-coumarique dans les vins libanais

Pour chaque domaine, le vin ayant la plus faible concentration en acide *p*-coumarique a été considéré comme matrice pour préparer une solution mère de concentration 20 mg.L⁻¹ par dissolution de l'acide d'abord dans 1 mL d'éthanol puis dans chaque vin en question. Cinq solutions de concentrations allant de 0,5 à 10 mg.L⁻¹ sont préparées par des dilutions convenables, à partir de chacune des solutions mères. La différence des aires des pics avant et après ajout de l'acide au vin, nous a permis de déterminer la surface du pic correspondante à la quantité d'acide *p*-coumarique ajoutée. On a pu ensuite tracer les courbes de calibration grâce à la régression linéaire (méthode des moindres carrés) où les aires des pics sont corrélées à leurs concentrations correspondantes. Deux exemples de droites d'étalonnage sont présentés sur la **Figure 15**.

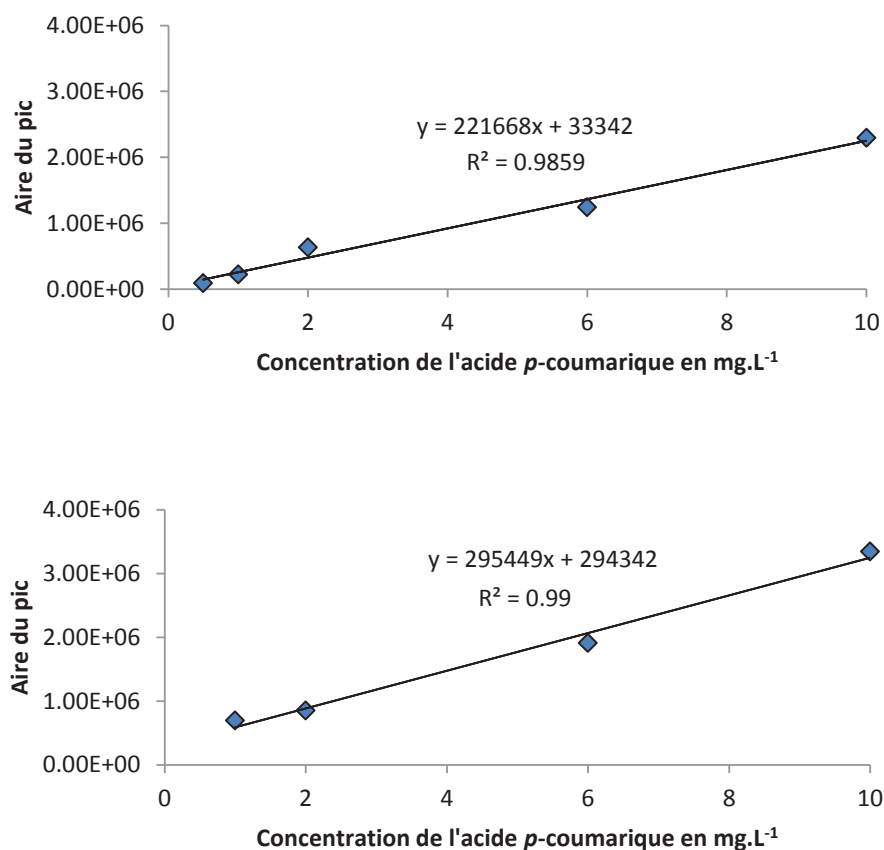


Figure 15. Exemples de droites d'étalonnage des vins issus des domaines E et L, respectivement.

La composition variée et très complexe des différents vins utilisés est à l'origine de la variation entre les pentes et entre les points de contact avec l'axe des ordonnées des différentes droites.

II.5.3. Dosage des 4-vinylphénols et 4-éthylphénols

II.5.3.1. Méthode choisie et conditions chromatographiques optimisées

Plusieurs approches ont été proposées pour la détermination quantitative des phénols volatils dans le vin. Ces analyses sont couramment effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un système de détection adéquat comme on l'a décrit dans le **Chapitre I**.

En raison de la complexité de la matrice et des faibles concentrations de ces composés dans le vin, une étape d'extraction et/ou de pré-concentration est généralement effectuée avant l'analyse chromatographique. En ce qui concerne l'étape d'extraction, plusieurs exemples de traitements ont été rapportés tels que l'Extraction Liquide-Liquide (LLE), l'Extraction en Phase Solide (SPE), la Microextraction en Phase Solide (SPME), la Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) et la Single Drop Microextraction (SDME) (Pizarro *et al.*, 2011).

De nouvelles méthodes plus rapides et surtout plus économiques viennent d'apparaître. Dans ce contexte, nous nous sommes inspirés de la méthode chromatographique en phase liquide couplée à un DAD qui a été décrite par Sáez *et al.* (2010 et 2011) pour déterminer les 4-vinylphénol et 4-éthylphénol :

Les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 1 min et filtrés à travers un filtre (nitrate de cellulose) de 0,2 μm avant l'analyse.

L'appareillage est une chromatographie liquide à haute pression Shimadzu avec une colonne (Restek Pinnacle II C18 column) de 5 μm - 250 x 4,4 mm, un injecteur automatique en boucle pleine (20 μL) et un détecteur UV-VIS.

La phase mobile est un gradient d'élution (5 min 20 % acétonitrile, 10 min 40 %, 30 min 60 %) suivi de 10 min de ré-équilibrage de la colonne après l'exécution du temps d'analyse.

L'acide formique est ajouté (0,12 g.L^{-1}) afin de réguler le pH à 3,5.

Le débit est fixé à 1 mL.min^{-1} et la détection est réalisée à 230 nm.

La quantification se fait par comparaison à des standards dans la gamme 0,5-100 mg.L^{-1} pour les 4-éthylphénols et 0,1-40 mg.L^{-1} pour les 4-vinylphénols.

Cette méthode a été modifiée en fonction de notre appareillage pour une meilleure détection de chacun des composés volatils recherchés. Le même appareillage décrit pour le dosage de l'acide *p*-coumarique a été utilisé mais nous avons modifié le gradient d'élution :

Un débit de $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ pour 5 min 20 % acétonitrile, 10 min 40 %, 10 min 60 % suivi de 10 min de ré-équilibration de la colonne.

Nous avons trouvé les longueurs d'onde optimales pour la détermination du 4-vinylphénol et du 4-éthylphénol. Ces valeurs sont de 258 et 224 nm, respectivement.

A notre connaissance, aucune autre approche semblable n'a été publiée.

Les étalons standards sont préparés dans l'intervalle $[0,5-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}]$ pour les deux composés.

II.5.3.2. Exemple de chromatogramme

Le chromatogramme suivant (**Figure 16**) montre le pic du 4-vinylphénol à un temps de rétention de 21 min. Il s'agit d'un point de la gamme étalon ayant une concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ préparé dans une solution à 10 % d'éthanol.

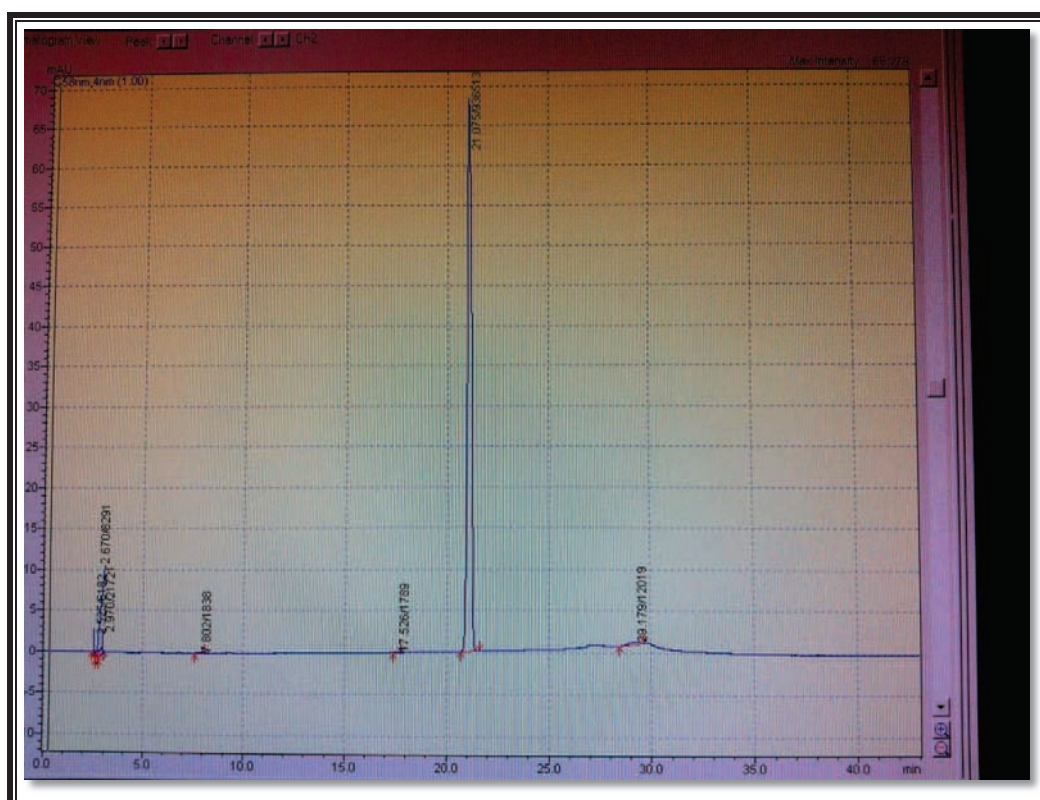


Figure 16. Chromatogramme du 4-vinylphénol (étalon à $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans une solution à 10 % éthanol) obtenu par HPLC/DAD à 258 nm.

II.5.3.3. Calcul de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ)

À partir d'une mesure faite sur un blanc analytique, l'écart type du signal est calculé. La limite de détection LOD correspond à la concentration qui conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois celle de l'écart type du blanc. La limite de quantification LOQ est calculée en prenant comme valeur du signal 10 fois la valeur de l'écart type du blanc (ACS, 1980). Dans notre étude, le blanc analytique est un vin d'un même domaine qui ne contient ni des 4-vinylphénols ni des 4-éthylphénols. Le nombre de mesures répétitives est supérieur à 20.

Avec notre méthode, la limite de détection obtenue a été de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ et la limite de quantification de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ pour les deux composés.

II.5.3.4. Méthode des ajouts dosés pour la mesure des concentrations de 4-éthylphénols dans les vins

Dans certains cas, la matrice de l'échantillon affecte le coefficient de réponse et cause une interférence avec la mesure des composés. Cet effet peut diminuer le signal en modifiant le rendement du détecteur, ou au contraire augmenter le signal par la présence des interférents : dans ces cas, on parle de l'effet matrice.

La réponse devient alors différente pour une même concentration d'analyte dans une solution standard ou dans un échantillon. Dans la méthode des ajouts dosés, on utilise l'échantillon lui-même comme matrice pour l'étalonnage, afin de compenser les effets de matrice. Une courbe d'étalonnage sera tracée en ajoutant à chaque fois des quantités d'analytes de concentration parfaitement connue sans modification du volume de l'échantillon. L'augmentation de l'aire de chaque composé entre deux analyses est liée proportionnellement à l'ajout de chaque quantité reconnue et permet de déterminer la quantité initiale de chaque soluté. La courbe d'étalonnage se présente comme suit (**Figure 17**).

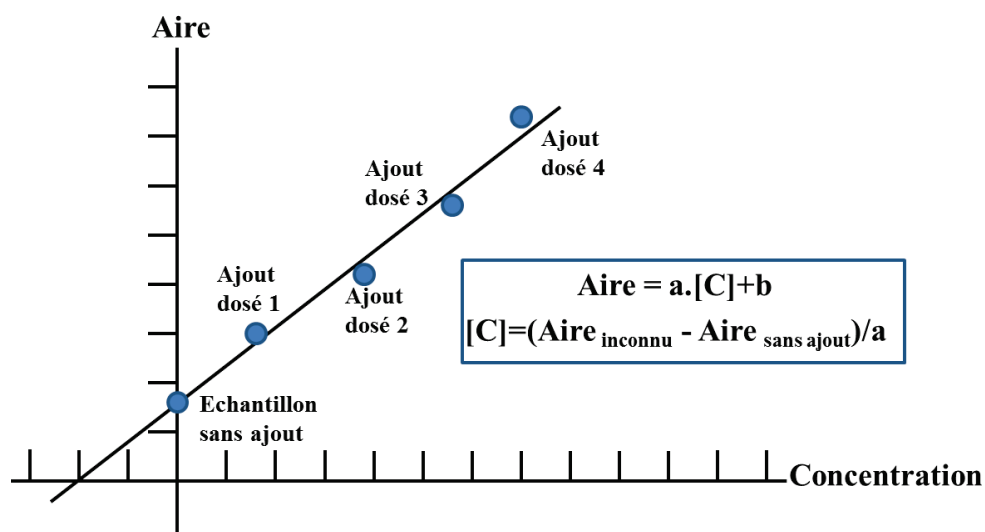


Figure 17. Courbe d'étalonnage type obtenue en utilisant la méthode d'ajouts dosés.

Cette méthode présente un intérêt pour l'analyse des traces et ultra-traces de composés dans des matrices complexes.

II.5.3.5. Défécation

Pour le dosage des phénols volatils dans un milieu riche en protéines (cas du milieu MYPG), un protocole de défécation est nécessaire afin d'éliminer ces constituants pouvant interférer avec le dosage des 4-vinylphénols et 4-éthylphénols dans les échantillons. Il consiste à mélanger, 0,5 mL de $ZnSO_4$ à 5 % et 0,5 mL de $Ba(OH)_2$ à 0,3 N à 2 mL d'échantillon. Après un temps de contact de 10 minutes environ, le précipité formé est éliminé par centrifugation ou filtration. Le dosage est alors possible sur le milieu clarifié.

II.6. Evaluation des paramètres cinétiques des réactions

II.6.1. Hypothèses et notations

On considère une expérience de fermentation en milieu liquide supposé parfaitement agité et parfaitement homogène en température.

t désigne le temps. Le temps $t=0$ correspond à l'inoculation de la fermentation.

Δt désigne un intervalle de temps.

On appelle $[X]$ ou $[X]_t$ la concentration en biomasse mesurée à l'instant t .

On appelle $[S]$ ou $[S]_t$ la concentration du substrat S mesurée à l'instant t.

On appelle $[P]$ ou $[P]_t$ la concentration de production P mesurée à l'instant t.

II.6.2. Détermination des paramètres de la croissance

- La vitesse de croissance à l'instant t est :

$$r_x = \frac{d[X]}{dt}$$

r_x s'exprime en « concentration de biomasse.temps⁻¹ » (levures.mL⁻¹.h⁻¹).

- La vitesse spécifique de croissance à l'instant t est :

$$\mu = \frac{r_x}{[X]} = \frac{d[X]}{dt} \frac{1}{[X]} \quad \mu \text{ s'exprime en temps}^{-1} \text{ (h}^{-1}\text{)}.$$

Pendant la phase exponentielle de croissance la vitesse spécifique de croissance (μ) est maximale et théoriquement constante, on l'appelle vitesse spécifique maximale de croissance ou taux exponentiel de croissance. On la désigne par μ_{\max} .

II.6.3. Calcul des vitesses relatives aux substrats et produits de la réaction

- La vitesse de consommation d'un substrat S à l'instant t est :

$$r_s = -\frac{d[S]}{dt}$$

r_s s'exprime en « concentration de S.temps⁻¹ » (mmol.L⁻¹.h⁻¹).

- La vitesse spécifique de consommation de S à l'instant t est :

$$Q_s = -\frac{r_s}{[S]} = -\frac{d[S]}{dt} \frac{1}{[S]}$$

Q_s s'exprime en « quantité de S.quantité de biomasse⁻¹.temps⁻¹ » (mmol.levures⁻¹.h⁻¹).

Comme précédemment :

- La vitesse de production du produit P à l'instant t est :

$$r_p = \frac{d[P]}{dt}$$

r_p s'exprime en « concentration de P.temps⁻¹ » (mmol.L⁻¹.h⁻¹).

- La vitesse spécifique de production de P à l'instant t est :

$$Q_P = \frac{r_P}{[P]} = \frac{d[P]}{dt} \frac{1}{[X]}$$

Q_P s'exprime en « quantité de P.quantité de biomasse⁻¹.temps⁻¹ » (mmol.levures⁻¹.h⁻¹).

II.6.4. Calcul des pourcentages, du taux de conversion et des rendements de production

- Le pourcentage d'acide *p*-coumarique disparu en début de réaction juste après l'ajout est donné par la formule :

$$AD(\%) = 100 - \left(\frac{\text{quantité détectée}}{\text{quantité théorique}} \times 100 \right)$$

- Le taux de conversion d'un substrat est défini comme le pourcentage du substrat consommé.

$$\tau = \frac{S_f - S_i}{S_i} \times 100$$

- Le pourcentage de disparition du bilan matière est donné par la formule :

$$D(\%) = 100 - \left(\frac{\text{bilan matière final}}{\text{quantité théorique}} \times 100 \right)$$

- Le rendement global en produit est défini comme le pourcentage du substrat transformé en produit.

$$RG = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \times 100$$

- Le rendement en produit en tenant compte de la quantité de bilan matière qui reste à la fin de la réaction est donné par la formule :

$$R = \frac{P_f - P_i}{\text{bilan matière final}} \times 100$$

Résultats et discussions

Chapitre III

Etat des lieux du risque « éthylphénol » dans les vins libanais

III.1. Introduction

« Tous les vins contiennent suffisamment d'acide *p*-coumarique (acide cinnamique le plus abondant) pour produire plusieurs milligrammes de 4-éthylphénol par litre de vin ! » (Chatonnet, 2012). Cet acide présent naturellement dans le raisin ne cause en lui-même aucun risque d'altération. Par contre, combiné à la présence de *Brettanomyces*, il peut induire une production importante de 4-éthylphénols, composé néfaste pour la qualité du vin.

Ce chapitre consiste à évaluer le risque de voir apparaître des 4-éthylphénols dans les vins libanais. Cette problématique a été peu étudiée dans cette région viticole en développement. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à mesurer la concentration en acide *p*-coumarique des vins rouges de différents domaines et de différents cépages cultivés au Liban. Ces concentrations permettent d'évaluer alors les niveaux de production de phénols volatils qui pourraient être atteints si la levure *Brettanomyces* se développait dans ces vins. La mesure des 4-éthylphénols a été également réalisée sur ces échantillons afin d'évaluer le nombre et le niveau de vins déjà contaminés. Enfin, le dépistage de la présence de levures *Brettanomyces* dans ces échantillons a été effectué.

III.2. Echantillonnage pour le dépistage et la mesure en acide *p*-coumarique et 4-éthylphénols

La campagne de dépistage a été réalisée sur 2 ans (2010-2011), avec 100 échantillons collectés au total. Ces échantillons proviennent de 16 établissements vinicoles différents (identifiés par des lettres de A à P afin de préserver l'anonymat), pour différents millésimes (variant de 1998 à 2011) et différents cépages. Actuellement, le nombre de domaines de vin libanais est de 33. Notre sélection représente donc une proportion représentative puisque nous avons sélectionné des vins de presque 50 % du total des domaines présents sur le territoire libanais.

Le nombre de bouteilles de vin fini sélectionné n'était pas important, ces derniers étant souvent stérilisés par filtration et supprimant ainsi toute présence microbienne avant l'embouteillage. Seuls 38 échantillons (38 %) de vins finis commercialisés ont été considérées pour cette étude, les 62 autres (62 %) ayant été collectés directement auprès de différents établissements vinicoles

qui ont accepté de nous accueillir. Sur ces 62 échantillons, 25 échantillons ont été prélevés en cuve en Inox, 25 en barriques, 10 en réservoirs en plastique et 2 en réservoirs en béton. Ces échantillons avaient terminé leur fermentation alcoolique et étaient en garde.

La méthode de dépistage des *Brettanomyces* présentée dans **Matériels et méthodes (partie II.1.4.)** a été appliquée aux 100 échantillons collectés mais le dosage de l'acide *p*-coumarique et des 4-éthylphénols n'a pu être réalisé que sur 67 de ces échantillons.

Il est à noter que la campagne de récolte des échantillons fut une étape difficile de ce travail en raison du refus de la majorité des œnologues libanais de nous fournir les échantillons (ce qui explique le nombre limité à 62 collecté). Pour eux, l'idée de dépistage microbiologique signifie la recherche d'un défaut dans leur vin et la notion de confidentialité des résultats n'est pas acceptée.

III.3. Dosage de l'acide *p*-coumarique et des 4-éthylphénols dans les vins libanais

Le **Tableau 14** récapitule la liste des vins libanais utilisés pour l'étude avec pour chacun la définition de l'origine, le millésime et le cépage. Pour les résultats du dépistage, le signe (+) signifie que le test est positif et le signe (-) qu'il est négatif. Les 2 dernières colonnes sont réservées aux dosages. 'n-m' signifie non-mesuré et '< 0,1 mg.L⁻¹' signifie qu'on n'a pas pu détecter des concentrations inférieures suivant la limite de détection de notre méthode d'analyse ou que l'échantillon ne contient pas de 4-éthylphénol.

Tableau 14. Résultats du dépistage *Brettanomyces* et teneurs en acide *p*-coumarique et en 4-éthylphénol des différents vins rouges libanais.

Domaine	Echantillons	Origine	Millésime	Cépages	Résultats du dépistage			Teneur en acide <i>p</i> -coumarique (mg.L ⁻¹) ± intervalle de confiance (5%)	Teneur en 4-éthylphénol (mg.L ⁻¹)
					GCA	ECA	Bi-test		
A	1	cuve en inox	2009	Syrah, Cabernet Sauvignon	+	+	-	8 ± 0,03	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	cuve en inox	2009	Syrah, Cabernet Sauvignon	+	+	-	8 ± 0,04	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	cuve en inox	2007	Syrah, Cabernet Sauvignon	+	+	-	18 ± 0,38	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	vin fini	2004	Syrah, Cabernet Sauvignon	-	-	-	16 ± 0,22	< 0,1 mg.L ⁻¹
	5	vin fini	2009	Syrah, Cabernet Sauvignon, Cinsault	-	-	-	10 ± 0,23	< 0,1 mg.L ⁻¹
	6	vin fini	2009	Syrah, Cabernet Sauvignon	-	-	-	10 ± 0,25	< 0,1 mg.L ⁻¹
	7	cuve en inox	2010	Cabernet Sauvignon	+	+	-	n-m	n-m
	8	cuve en inox	2010	Syrah	+	+	-	n-m	n-m
	9	cuve en inox	2010	Cinsault	+	+	-	n-m	n-m
B	1	cuve en inox	2009	50% Cabernet Franc, 50% Syrah	-	-	-	11,2 ± 0,16	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	cuve en inox	2009	100% Cabernet Franc	-	-	-	11 ± 0,13	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	cuve en inox	2009	100% Syrah	-	-	-	11,5 ± 0,3	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	barrique	2008	50% Cabernet Franc, 50 % Syrah	-	-	-	5,2 ± 0,17	< 0,1 mg.L ⁻¹
	5	cuve en inox	2010	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
	6	cuve en inox	2010	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
7	cuve en inox	2010	Syrah	-	-	-	n-m	n-m	
8	cuve en inox	2010	Merlot	-	-	-	n-m	n-m	
9	cuve en inox	2010	Cabernet Franc	-	-	-	n-m	n-m	
10	cuve en inox	2010	Cabernet Sauvignon, Merlot	-	-	-	n-m	n-m	
11	cuve en inox	2010	Syrah, Cabernet Franc	-	-	-	n-m	n-m	
12	barrique	2009	Merlot	-	-	-	n-m	n-m	
13	barrique	2009	Pinot Noir	-	-	-	n-m	n-m	
14	barrique	2009	Petit Verdot	-	-	-	n-m	n-m	
15	barrique	2009	composition inconnue	-	-	-	n-m	n-m	

	16	barrique	2008	composition inconnue	-	-	-	n-m
	17	vin fini	2007	composition inconnue	-	-	13 ± 0,28	< 0,1 mg.L ⁻¹
	18	vin fini	2006	Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah	-	-	10 ± 0,32	< 0,1 mg.L ⁻¹
	19	vin fini	2004	Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Syrah	-	-	8,4 ± 0,06	< 0,1 mg.L ⁻¹
	20	vin fini	2007	Caladoc, Pinot Noir	-	-	12 ± 0,21	< 0,1 mg.L ⁻¹
C	1	cuve en inox	2008	Cabernet Sauvignon	-	-	20,1 ± 0,13	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	cuve en inox	2008	Syrah	+	+	31,4 ± 0,27	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	barrique	2008	Cabernet Sauvignon	-	-	18,4 ± 0,38	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	barrique	2008	Syrah	-	-	20 ± 0,25	< 0,1 mg.L ⁻¹
D	1	barrique	2008	Syrah	-	-	17,7 ± 0,21	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	barrique	2008	Merlot	-	-	10 ± 0,05	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	barrique	2008	Cabernet Sauvignon	-	-	8 ± 0,4	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	barrique	2007	Syrah	-	-	10 ± 0,26	< 0,1 mg.L ⁻¹
	5	cuve en inox	2009	70% Cabernet Sauvignon, 20% Merlot, 10% Syrah	-	-	6 ± 0,32	< 0,1 mg.L ⁻¹
	6	cuve en inox	2010	Cabernet Sauvignon	+	+	n-m	n-m
	7	cuve en inox	2010	Syrah	+	+	n-m	n-m
	8	cuve en inox	2010	Merlot	-	-	n-m	n-m
	9	vin fini	2008	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	9 ± 0,15	< 0,1 mg.L ⁻¹
	10	vin fini	2009	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	10 ± 0,12	< 0,1 mg.L ⁻¹
	11	vin fini	2007	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	10,4 ± 0,31	< 0,1 mg.L ⁻¹
	12	vin fini	2008	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	9,3 ± 0,26	< 0,1 mg.L ⁻¹
E	1	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	23 ± 0,55	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	barrique	2009	70% Merlot, 15% Petit Verdot, 15% Syrah	-	-	25,5 ± 0,32	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	cuve en inox	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	21 ± 0,43	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	vin fini	2002	Syrah, Grenache, Cabernet Sauvignon	-	-	19 ± 0,22	< 0,1 mg.L ⁻¹
	5	cuve en béton	2010	50% Cabernet Sauvignon, 40% Merlot, 10% Petit Verdot	-	-	n-m	n-m
	6	cuve en inox	2009	50% Syrah, 50% Cinsault	-	-	n-m	n-m

	7	cuve en béton	2010	50% Syrah + Cinsault, 30% Grenache, 20% Merlot	-	-	n-m	n-m
	8	cuve en inox	2008	50% Cabernet Sauvignon, 50 % Merlot	-	-	n-m	n-m
	9	barrique	2010	Syrah	-	-	n-m	n-m
	10	barrique	2009	70 % Merlot, 15 % Petit Verdot, 15% Syrah	-	-	n-m	n-m
	11	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	n-m	n-m
	12	vin fini	2008	Syrah, Grenache, Cabernet Sauvignon	-	-	16 ± 0,48	< 0,1 mg.L ⁻¹
	13	vin fini	2008	Syrah, Cinsault, Grenache, Cabernet Sauvignon	-	-	16,4 ± 0,23	< 0,1 mg.L ⁻¹
	14	vin fini	2002	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	13,4 ± 0,13	< 0,1 mg.L ⁻¹
	15	vin fini	2006	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	15,5 ± 0,31	< 0,1 mg.L ⁻¹
	16	vin fini	2007	Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah	-	-	17,8 ± 0,1	< 0,1 mg.L ⁻¹
F	1	vin fini	2001	Cabernet Sauvignon, Merlot, Petit Verdot	-	-	10,2 ± 0,28	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	vin fini	2006	Cabernet Sauvignon, Merlot, Petit Verdot	-	-	13 ± 0,21	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	vin fini	2007	50 % Gamay, 50 % Tempranillo	-	-	12,3 ± 0,14	< 0,1 mg.L ⁻¹
G	1	vin fini	2000	Cabernet Sauvignon	-	-	0	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	vin fini	2007	Cabernet Sauvignon, Syrah, Cinsault	-	-	20 ± 0,35	< 0,1 mg.L ⁻¹
H	1	vin fini	2008	Syrah, Merlot	-	-	5 ± 0,09	< 0,1 mg.L ⁻¹
I	1	vin fini	1998	Cinsault, Cabernet Franc	-	+	7 ± 0,05	0,567
	2	vin fini	2002	composition inconnue	-	-	5 ± 0,06	0,325
	3	vin fini	2007	Cinsault, Carignan, Cabernet Sauvignon, Syrah	-	-	19 ± 0,22	< 0,1 mg.L ⁻¹
	4	vin fini	2008	Cinsault, Carignan, Cabernet Sauvignon, Syrah	-	-	16,8 ± 0,09	< 0,1 mg.L ⁻¹
J	1	vin fini	2000	Cabernet Sauvignon, Mourvèdre, Carignan	-	-	14,4 ± 0,24	< 0,1 mg.L ⁻¹
K	1	vin fini	2009	50 % Cinsault, 50 % Syrah	-	-	3,7 ± 0,15	0,678
	2	vin fini	2007	70 % Cinsault, 10 % Cabernet Sauvignon, Syrah	-	-	18,1 ± 0,08	< 0,1 mg.L ⁻¹
	3	vin fini	2006	Cabernet Sauvignon, Syrah	-	-	11 ± 0,07	< 0,1 mg.L ⁻¹

	4	vin fini	2001	Cabernet Sauvignon, Syrah	-	-	-	5,5 ± 0,1	< 0,1 mg.L ⁻¹
	5	vin fini	2008	Cabernet Sauvignon, Syrah, Mourvèdre, Carignan	-	-	-	4 ± 0,4	1,218
	6	vin fini	2007	Cabernet Sauvignon, Syrah, Mourvèdre, Carignan	-	-	-	4 ± 0,06	1,367
L	1	cuve en plastique	2009	Merlot	-	-	-	11 ± 0,06	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	cuve en plastique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	8,2 ± 0,03	0,256
	3	cuve en plastique	2009	Cabernet Sauvignon	+	+	-	6,5 ± 0,07	0,583
	4	cuve en plastique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	13 ± 0,06	
	5	cuve en plastique	2009	Syrah	+	+	-	6,6 ± 0,07	0,665
	6	cuve en plastique	2008	Cabernet Sauvignon	-	-	-	6,6 ± 0,13	0,234
	7	cuve en plastique	2009	Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon 5 à 10 %	-	-	-	8 ± 0,04	0,221
	8	cuve en plastique	2009	Merlot, Syrah	-	-	-	13,2 ± 0,05	< 0,1 mg.L ⁻¹
	9	cuve en plastique	2008	Merlot, Syrah	-	-	-	9,3 ± 0,12	< 0,1 mg.L ⁻¹
	10	cuve en plastique	2008	Merlot, Syrah	-	-	-	9,5 ± 0,5	< 0,1 mg.L ⁻¹
M	1	vin fini	2007	Syrah	-	-	-	18,4 ± 0,07	< 0,1 mg.L ⁻¹
N	1	barrique	2009	Merlot	-	-	-	n-m	n-m
	2	barrique	2009	Syrah	-	-	-	n-m	n-m
	3	barrique	2009	Petit Verdot	-	-	-	n-m	n-m
	4	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
	5	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
	6	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
	7	barrique	2009	Cabernet Sauvignon	-	-	-	n-m	n-m
	8	barrique	2009	Mourvèdre	-	-	-	n-m	n-m
O	1	vin fini	2009	60% Cabernet Sauvignon, 30% Merlot, 10% Syrah	-	-	-	13,5 ± 0,13	< 0,1 mg.L ⁻¹
	2	vin fini	2009	60% Cabernet Sauvignon, 30% Merlot, 10% Syrah	-	-	-	11,5 ± 0,06	< 0,1 mg.L ⁻¹
P	1	vin fini	2007	composition inconnue	-	-	-	8,7 ± 0,14	< 0,1 mg.L ⁻¹

III.4. Discussions

III.4.1. Discussion des valeurs obtenues pour l'acide *p*-coumarique

La concentration de l'acide *p*-coumarique dans les vins libanais analysés varie entre 0 (vin G1) et 32 mg.L⁻¹ (C2) avec une moyenne de concentration de 12 mg.L⁻¹ sur les 67 échantillons. La **Figure 18A** montre la répartition des concentrations. On remarque facilement que la majorité des échantillons possèdent des teneurs entre 5 et 10 mg.L⁻¹ suivie de 10 et 15 et ensuite 10 et 20. Les valeurs sont relativement élevées par rapport aux concentrations trouvées dans la littérature. En effet, dans les vins tures, cette concentration varie en fonction du cépage entre 1,21 (Syrah) et 4,21 mg.L⁻¹ (Cabernet Sauvignon) (Ozkan et Baydar, 2006). De son côté, Avar *et al.* (2007) a obtenu des concentrations qui varient entre 1,8 et 9,5 mg.L⁻¹ dans les vins hongrois. De plus, dans deux études différentes, l'une effectuée sur des vins italiens et l'autre sur des vins espagnols, Gambelli *et al.*, 2003 et Russo *et al.*, 2008 ont trouvé 11,8 mg.L⁻¹ comme valeur maximale pour l'acide *p*-coumarique dans leur vin alors qu'une étude sur des vins thaïlandais a révélé la présence de 18,33 et de 25,9 mg.L⁻¹. La région viticole principale au Liban est la plaine de la Békaa. Le soleil brille en moyenne 300 jours par an dans cette région et une large exposition des grappes au rayonnement solaire peut augmenter fortement la quantité d'acide *p*-coumarique dans le vin (Davaux et Renard, 2001). Cela pourrait être, probablement, la raison d'une concentration élevée en acide *p*-coumarique au Liban. Ainsi, on peut conclure que les cépages couramment employés pour l'élaboration des vins libanais possèdent un fort potentiel en esters hydroxycinnamoyltartriques précurseurs de l'acide *p*-coumarique. On peut donc raisonnablement imaginer que les vins élaborés à partir de ces variétés sont susceptibles de développer, au cours du cycle de production ou lors de la conservation, des odeurs phénolées marquées en présence de *Brettanomyces*.

III.4.2. Discussion des valeurs obtenues pour le 4-éthylphénol

Seuls 10 échantillons sur les 67 analysés présentent de fortes teneurs en 4-éthylphénol. Ces valeurs s'étalent entre 0,221 et 1,367 mg.L⁻¹ avec 9 % des échantillons présentant une valeur au-dessus du seuil de perception des 4-éthylphénols qui est de 450 µg.L⁻¹.

Ces 10 échantillons correspondent à des échantillons avec des teneurs en acide inférieures à 8 mg.L⁻¹ (**Figure 18B**) ce qui est assez faible par rapport à la moyenne. Le niveau initial était

cependant plus élevé puisqu'une partie a été transformée en 4-éthylphénol. Notons que l'activité *Brettanomyces* n'a pas permis d'épuiser tout le substrat puisque de l'acide *p*-coumarique résiduel est tout de même détecté.

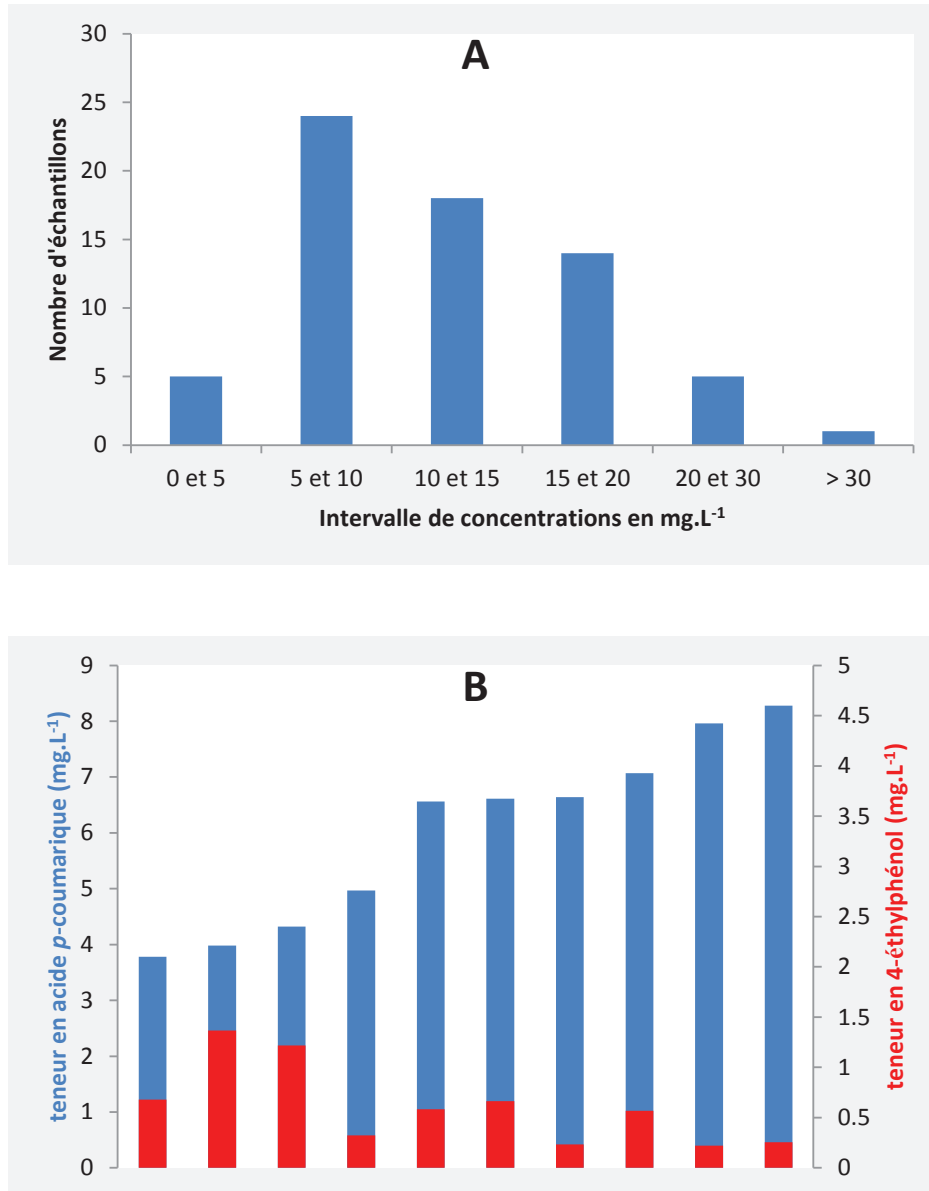


Figure 18. (A) répartition des échantillons en fonction de la concentration en acide *p*-coumarique, (B) lien entre teneurs en acide *p*-coumarique et en 4-éthylphénol dans les vins rouges libanais.

III.4.3. Discussion des résultats du dépistage de *Brettanomyces*

Sur 100 échantillons étudiés sur 2 ans et en se basant sur les résultats du Bi-Test, 3 échantillons se sont révélés positifs pour la présence de *Brettanomyces*. Ces 3 échantillons ont présenté également des teneurs en 4-éthylphénol supérieures à 550 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ce qui apparaît cohérent. Dans les 7 autres échantillons présentant des concentrations en 4-éthylphénol, les *Brettanomyces*, soupçonnées être présentes, n'ont pas été détectées. Une filtration avant embouteillage pourrait expliquer que les *Brettanomyces* n'aient pas été retrouvées dans les échantillons vins finis (4 échantillons concernés). C'est plus surprenant pour les échantillons prélevés en cuve plastique (3 échantillons concernés).

Pour les 3 échantillons positifs, deux isolats ont été récupérés à partir de 2 cuves différentes de vin en cours d'élevage d'un même domaine (domaine L) alors qu'un troisième isolat a été issu d'un vin fini d'un autre domaine (domaine I). Une première étude réalisée par Medawar (2003) n'avait pas détecté la présence de ces levures dans les vins libanais. Cette étude avait été faite sur 48 échantillons provenant de 12 vins avec pour chacun 4 analyses différentes : une première analyse avait été faite sur le moût juste après sulfitage et en début de la fermentation alcoolique, une deuxième analyse à la fin de la fermentation alcoolique, une troisième à la fin de la macération, après le dernier remontage et une dernière après la fermentation malolactique.

Les vins du domaine L dans lesquels 2 isolats ont été détectés sont élevés dans des cuves en plastique. Dans les dernières années, l'emploi de ces réservoirs en plastique de 2 à 22 hL a augmenté en œnologie. Cette augmentation est liée à la résolution de tous les problèmes découlant du transfert d'odeurs de plastique grâce à l'emploi de nouveaux matériaux appropriés. De plus, ces réservoirs poreux peuvent avoir une perméabilité contrôlée à l'oxygène ce qui rend leur utilisation plus attrayante dans les caves (Del Alamo *et al.*, 2010). Ils sont utilisés pour la conservation ainsi que pour le vieillissement du vin par ajout de pièces de bois qui peuvent fournir les mêmes caractéristiques organoleptiques des vins vieillis en fûts.

Le manque d'hygiène peut être la cause de la contamination. Cependant, la synthèse bibliographique a montré des cas de contamination dans des domaines où l'hygiène était correcte car la contamination peut avoir lieu sur la matière première elle-même où au cours des vendanges, avant l'arrivée à la cave.

L'étape d'enrichissement et de réactivation a été une étape clé pour détecter la présence des levures *Brettanomyces* dans une ancienne bouteille de vin (Domaine I, 1998). Dans les autres vins finis du même domaine, on n'a pas décelé l'existence de ces levures. On sait que lorsque *Brettanomyces* pousse dans le vin, elle produit plusieurs composés qui peuvent altérer le palais et le bouquet. Toutefois, notons que les œnologues du domaine I considèrent que la présence de ces composés à bas niveau peut avoir un effet positif sur le vin, en contribuant à la complexité et donnant un caractère distinctif à certains de leurs vins rouges.

Neuf autres résultats positifs étaient retenus après les étapes sur milieux GCA et ECA. En revanche, ces colonies n'ont pas été capables de former un halo translucide lors du test sur milieu MSBT. L'identification de ces microorganismes n'était pas de l'intérêt de ce travail. Mais, d'après la bibliographie, *Candida*, *Pichia*, *Kloeckera* et *Zygosaccharomyces* sont des levures répertoriées en œnologie qui peuvent résister à l'actidione comme *Brettanomyces*. Cependant, les trois premières sont sensibles à l'alcool ce qui réduit la possibilité de les retrouver dans nos échantillons de vins. Il reste à valider si les microorganismes qui se sont développés sur le milieu GCA et qui n'ont pas le caractère acidifiant sont des *Zygosaccharomyces* ou autres.

III.5. Identification génétique des souches de levures isolées à partir du vin

III.5.1. Amplification du gène codant la sous unité ribosomique 26S

Grâce à sa structure très conservée, l'étude de l'ADNr 26S constitue une approche rapide pour distinguer entre les différentes espèces de levures. Dans ce but, nous avons utilisé les amorces DBRUXF et DBRUXR qui ont été désignées spécifiquement pour identifier l'espèce *Dekkera bruxellensis* par Phister et Mills (2003) après alignement des séquences de l'ADNr 26S de 5 espèces de *Dekkera* et de *Brettanomyces* et délimitation des régions conservées. La PCR réalisée avec ce couple d'amorces sur de l'ADN génomique provenant des différents isolats français et libanais a montré une amplification d'un fragment d'environ 79 pb correspondant à la taille attendue (**Figure 19**). Ceci indique que les 5 isolats appartiennent à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*.

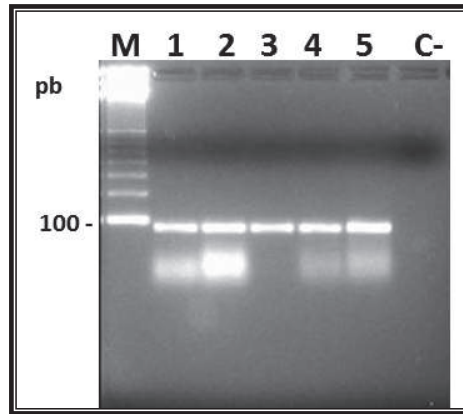


Figure 19. Profil électrophorétique de la région ADN_r amplifiée par PCR avec les amorces DBRUXF et DBRUXR pour les 5 souches de levures isolées du vin. Les colonnes (1, 2) représentent respectivement les souches françaises F1 et F2 alors que les colonnes (3, 4, 5) représentent les isolats libanais L1, L2 et L3. La colonne M est réservée au marqueur de taille moléculaire. La colonne C⁻ représente le contrôle négatif (absence d'ADN). Cette colonne ne doit présenter aucune bande pour assurer qu'il n'y a pas de contamination dans nos échantillons amplifiés.

III.5.2. Amplification et polymorphisme des séquences ITS

La méthode de PCR a été aussi bien utilisée pour amplifier une région spécifique du génome de *Brettanomyces* (les ITS) qui va servir à la technique de RFLP. Cette combinaison de PCR-RFLP permet l'identification de catégories de souches.

La taille de cette région (ITS) étant théoriquement identique pour tous les individus d'une espèce donnée, mais sa séquence nucléotidique différente d'une espèce à l'autre (James *et al.*, 1996), elle est actuellement la base de nombreuses études taxonomiques.

Les amorces **ITS1** et **ITS4** ont été utilisées pour amplifier la région incluant l'ADN 18S en amont et l'ADN 28S en aval incluant l'ADN 5,8S (**Figure 18**). La taille des produits de PCR obtenus est de 500 pb pour chacun des isolats F1, F2, L1, L2 et L3 sachant que les tailles des fragments générés varient entre 450 et 500 pb pour toutes les levures du genre *Brettanomyces* et entre 600 et 900 pb pour les autres populations de levures spécifiques au raisin et au vin (Egli *et al.*, 1999).

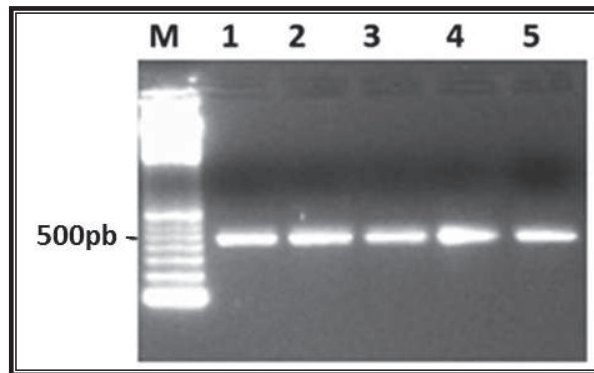


Figure 20. Produits de PCR purifiés avant la digestion enzymatique.

Après avoir réalisé la PCR avec les amorces ITS1 et ITS4 sur les 5 isolats, un volume des produits de PCR de chaque souche a été purifié (**Figure 20**) et a subi une hydrolyse sous l'action de chacune des 3 enzymes de restriction suivantes *Hinf I* (**Figure 21 A**), *Hae III* (**Figure 21 B**) et *Cfo I* (**Figure 21 C**) selon la procédure décrite par Guillamón *et al.* (1998). La taille approximative des produits de PCR amplifiés ainsi que celle des fragments de restriction observés après digestion avec les 3 endonucléases de restriction chez les différents isolats étudiés sont résumées dans le **Tableau 15**.

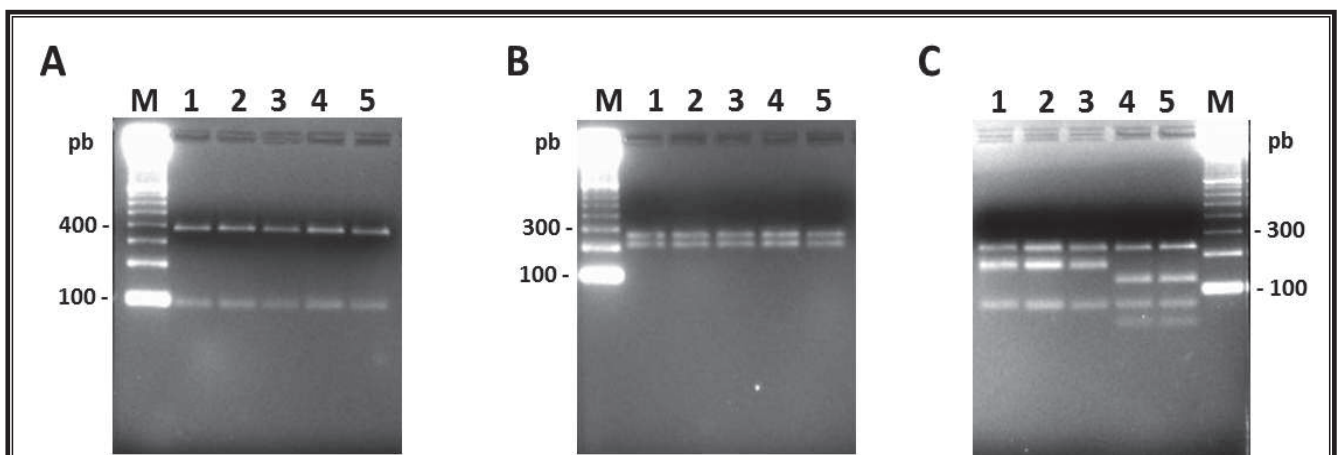


Figure 21. Fragments de restriction des différents produits de PCR obtenus avec les enzymes (A) *Hae III*, (B) *Hinf I* et (C) *Cfo I*. Les produits ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3 %. Les colonnes (1, 2, 3) représentent respectivement les isolats libanais L1, L2 et L3 alors que les colonnes (4, 5) représentent les souches françaises F1 et F2. La colonne M est réservée au marqueur de taille moléculaire.

Tableau 15. Comparaison des tailles des fragments de restriction des isolats et des souches de référence.

Souche	Taille du fragment de restriction (pb)			Référence
	<i>Hinf I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Cfo I</i>	
<i>Brettamyces bruxellensis</i>	265, 215	375, 105	230, 130, 80	Guillamón <i>et al.</i> , 1998
<i>Dekkera intermedia</i>	265, 215	375, 105	230, 130, 80	Guillamón <i>et al.</i> , 1998
F1	265, 215	375, 105	230, 130, 80, 50	Notre étude
F2	265, 215	375, 105	230, 130, 80, 50	Notre étude
L1	265, 215	375, 105	230, 180, 80	Notre étude
L2	265, 215	375, 105	230, 180, 80	Notre étude
L3	265, 215	375, 105	230, 180, 80	Notre étude

L'hydrolyse par *Hinf I* de la région ITS a montré que toutes les isolats possèdent des profils de restriction identiques entre elles sachant que la taille des fragments obtenus est de 265 et 215 pb pour l'ensemble des 5 isolats. Des résultats similaires sont observés avec l'enzyme *Hae III* où les 2 fragments formés présentent respectivement les tailles de 375 et 105 pb. Le nombre et la taille des fragments de restriction générés chez les isolats F1, F2, L1, L2 et L3 corroborent les données obtenues par Guillamón *et al.* (1998) et Puig *et al.* (2010). Ceci confirme l'identité commune des 5 isolats étudiés suggérant ainsi qu'elles appartiennent à l'une des 2 espèces de *B. bruxellensis* ou *D. Intermedia*.

Cependant, l'obtention du fragment de 79 pb avec la paire d'amorces DBRUXF-DBRUXR élimine la possibilité de retrouver la souche *D. Intermedia* et assure l'appartenance de nos isolats à l'espèce *B. bruxellensis*. Ces résultats confirment bien que nos isolats dérivent de l'espèce *B. bruxellensis* en concordance avec les résultats de Mittrakul *et al.* (1999).

La digestion par l'enzyme *Cfo I* présente des profils de restriction identiques entre les souches [F1, F2] d'une part, et les isolats [L1, L2, L3] d'autre part. Sur la **Figure 21**, cette enzyme montre 3 bandes c'est-à-dire 2 sites de coupure qui ont généré 3 fragments de restriction pour les isolats libanais alors que pour les souches françaises 4 fragments issus de 3 sites de coupure ont été observés. L'enzyme *Cfo I* nous a donc permis de différencier les 2 lots de souches génétiquement différentes, le premier regroupant les souches F1 et F2 et le second, les souches L1, L2 et L3. Ce résultat nous a permis de mettre en évidence la présence d'un polymorphisme de la région ITS incluant l'ADNr 5.8S entre les isolats français et libanais.

Notons aussi que nous avons obtenu après digestion, des fragments formant ensemble une taille de 490 pb pour chacune des 5 souches alors que les résultats de Guillamón *et al.* (1998) montrent des fragments formant une taille de 440 pb sachant que la taille initiale des amorces est de 500 pb.

III.5.3. Séquençage et phylogénie

Le recours à des techniques plus avancées comme le séquençage des amplicons de la région ITS des souches est nécessaire pour révéler l'identité génétique des groupes constitués par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. Par ailleurs, cette approche moléculaire (séquençage) est souvent utilisée comme une méthode complémentaire à la PCR-RFLP dans les études de diversité génétique afin d'étudier les liens phylogénétiques entre les isolats en comparaison avec des souches de références déjà identifiées et enregistrées dans les bases de données et par élaboration d'un dendrogramme.

Un dendrogramme (ou arbre phylogénétique) est un arbre schématique qui montre les relations de parentés existantes entre des organismes vivants. Chaque nœud représente l'ancêtre commun de ses descendants. L'arbre peut être enraciné ou pas, selon qu'on est parvenu à identifier l'ancêtre commun à toutes les feuilles.

Le séquençage de cette région polymorphique doit permettre de confirmer les résultats obtenus par RFLP et de dresser le dendrogramme correspondant.

Sur la Figure 22, la région ADNr 18S (couleur bleue) se termine à la position 11, la région ADNr 5.8S (couleur grise) s'étend de la position 105 à 262, la région ADNr 28S (couleur violette) commence à la position 395 et se termine à 431 avant l'amorce ITS4 (couleur vert clair) qui s'étend entre 432 et 451. Les régions ITS1 et ITS2 (sans couleur) se trouvent entre les positions 12-104 et 263-394, respectivement. Les nucléotides colorés en jaune montrent le site de coupure de l'enzyme *CfoI* tandis que les nucléotides colorés en rouge montrent celui de *HinfI* et ceux en vert foncé montre celui de *HaeIII*.

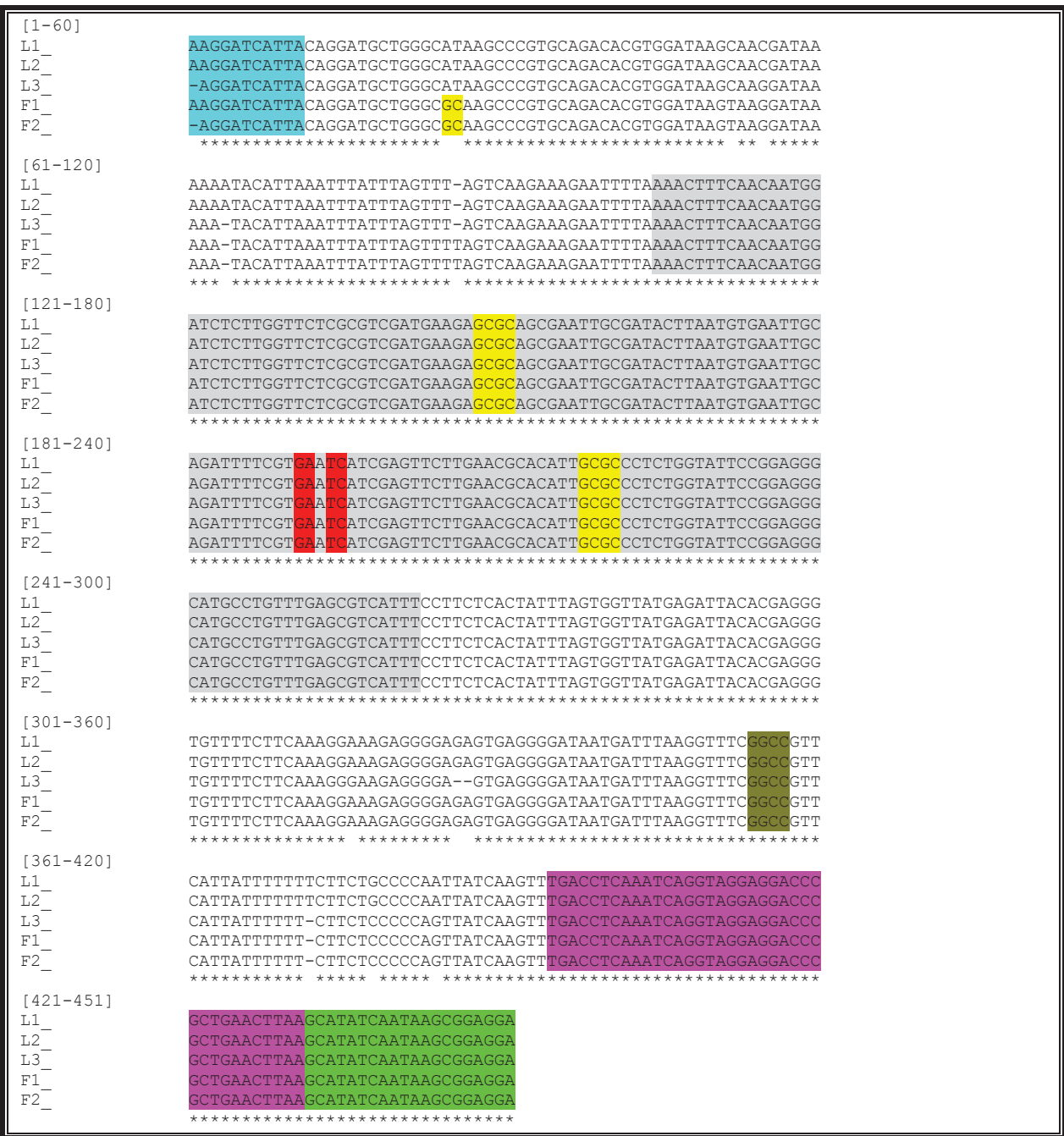


Figure 22. Alignement des différentes séquences de fragments amplifiés de la région ITS1-ITS4 (obtenus à partir du logiciel *Clustal W version 1.81*). Les nucléotides conservés sont présentés par des astérisques tandis que l'espace blanc représente les différences.

L'analyse des séquences a montré les mutations suivantes (Tableau 16) :

Tableau 16. Localisation des variations entre les séquences.

Position	Type de mutations
1	Délétion de A chez L3 et F2
25-26	Substitution de AT par GC chez F1 et F2
52	Substitution de C par T Chez F1 et F2
55	Substitution de C par G chez L3, F1 et F2
64	Délétion de A chez L3, F1 et F2
86	Délétion de T chez L1, L2 et L3
316	Substitution de A par G chez L3
326-327	Délétion de GA L3
372	Délétion de T chez L3, F1 et F2
378	Substitution de C par G chez F1 et F2
384	Substitution de G par A chez F1 et F2

L'analyse des séquences nous a aussi permis de dresser le dendrogramme de la **Figure 23**. Ce dendrogramme est divisé en 2 groupes, l'un comportant les isolats français d'une part et l'autre comportant les libanais. En effet, ce dernier groupe est lui-même subdivisé en 2 sous-groupes ou sous-familles. Il montre l'unicité de L3 qui s'est avérée bien différente de L1 et L2.

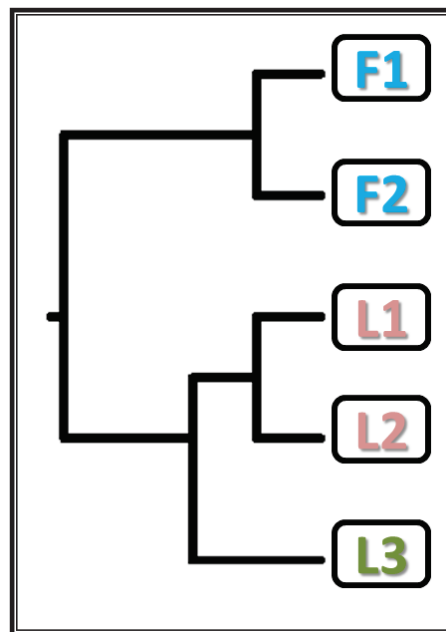


Figure 23. Dendrogramme (issu de Clustal W) représentant les liens de parenté entre les différents isolats de cette étude.

Après séquençage et recherche des sites de restriction des 3 enzymes *Hinf I*, *Hae III* et *Cfo I*, des corrections et des précisions sur la taille des fragments obtenus par RFLP s'imposent. Ces valeurs sont résumées dans le **Tableau 17**. La dernière colonne montre les résultats obtenus par Guillamón *et al.* (1998) pour des souches isolées en Espagne.

Tableau 17. Comparaison entre les tailles des fragments de restriction (pb) obtenus par les deux techniques.

technique	enzyme de restriction	sites de coupures	Souches					Guillamón <i>et al.</i> (1998)
			F1	F2	L1	L2	L3	
PCR-RFLP	<i>Hinf I</i>	G'ANTC	265, 215	265, 215	265, 215	265, 215	265, 215	265, 215
	<i>Hae III</i>	GG'CC	375, 105	375, 105	375, 105	375, 105	375, 105	375, 105
	<i>Cfo I</i>	G'CGC	230, 130, 80, 50	230, 130, 80, 50	230, 180, 80	230, 180, 80	230, 180, 80	230, 130, 80
Séquençage génétique	<i>Hinf I</i>	G'ANTC	260, 211	260, 211	260, 211	260, 211	260, 211	
	<i>Hae III</i>	GG'CC	375, 96	375, 96	375, 96	375, 96	375, 96	
	<i>Cfo I</i>	G'CGC	231, 125, 70, 45	231, 125, 70, 45	231, 170,70	231, 170,70	231, 170,70	

III.5.4. Numéros d'accèsion des séquences (GenBank)

Les séquences de gènes ARNr 5.8S y compris les séquences partielles de la région ITS1-ITS2 pour les 5 isolats de *Brettanomyces* ont été enregistrées dans la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information) sous les numéros d'accèsion suivants : GenBank ID: JQ327829, JQ327830, JQ327831, JQ327832 et JQ327833 pour F1, F2, L1, L2 et L3 respectivement.

III.6. Conclusions générales

Au terme de cette partie, on retiendra que :

- Les teneurs en acide *p*-coumarique dans les vins rouges libanais sont élevées par rapport aux autres vins étudiés dans la littérature. La concentration maximale est de 32 mg.L⁻¹ avec une moyenne de 12 mg.L⁻¹ pour les échantillons analysés.

- 15 % des vins analysés contiennent du 4-éthylphénol dont 9 % dépassent le seuil de perception de ce composé (0,5 mg.L⁻¹).
- La levure *Brettanomyces* a été détectée pour la première fois dans les vins libanais, mais le pourcentage de présence reste assez faible (3 positifs sur un total de 100).
- Toutes les souches isolées du vin appartiennent à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*.
- Deux profils obtenus après digestion enzymatique par *Cfo* I permettent de mettre en évidence une différence génétique au sein des souches provenant de différentes origines géographiques.
- Le séquençage génétique montre bien l'hétérogénéité déjà révélée de l'étude enzymatique. Le dendrogramme issu de l'étude des séquences génétiques confirme une différence entre les souches libanaises qui ont montré un profil identique par la technique de PCR-RFLP.

Chapitre IV

**Bioconversion de l'acide
p-coumarique par différentes
souches de *Brettanomyces
bruxellensis***

IV.1. Introduction

Par les techniques moléculaires décrites dans le chapitre précédant, nous avons pu différencier les souches provenant d'origines géographiques différentes. Le but de ce chapitre est de tester les capacités des diverses souches à transformer l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénols pour voir s'il existe une corrélation entre les différences génétiques et les quantités de produits formées et/ou les cinétiques de bioconversion. Nous essaierons également de comprendre les mécanismes résultant de l'activité successive des deux enzymes impliquées.

Cependant, afin de pouvoir comprendre correctement les cinétiques, il est nécessaire de tester la disponibilité du substrat dans le milieu. Nous commencerons donc ce chapitre par une présentation d'une expérience préliminaire sur la stabilité de l'acide *p*-coumarique dans le milieu synthétique de fermentation.

IV.2. Disparition/Réactivité de l'acide *p*-coumarique dans le milieu d'étude

IV.2.1. Problématique

Dans la bibliographie, des problèmes majeurs sont évoqués quant à l'utilisation de l'acide *p*-coumarique. En effet, Medawar *et al.* (2003) ont trouvé une instabilité à haute température avec une perte de masse après autoclavage des milieux. O'Neill *et al.* (1996) quant à eux, ont parlé d'une perte lors du dosage dans un milieu complexe tel que le vin. Plus récemment, dans les travaux de Salameh *et al.* (2008), outre l'instabilité à température élevée, deux autres voies de disparition de cet acide dans les conditions œnologiques sont citées :

- En premier lieu, il s'agit d'une réaction d'estérification qui se produit entre l'acide et l'alcool mais qui reste faible tant que la concentration en éthanol n'est pas très élevée (<10 %) et le pH pas trop acide (>3,5).
- En deuxième lieu, il s'agit de l'adsorption de cet acide sur les parois des *Brettanomyces* et par suite sa disparition du milieu d'étude.

En vue de développer ces hypothèses, nous nous sommes intéressés à l'effet de la lumière du jour sur la stabilité de l'acide *p*-coumarique et au phénomène d'adsorption dans nos milieux.

IV.2.2. Effet de la lumière du jour sur la stabilité de l'acide *p*-coumarique

La stabilité de l'acide *p*-coumarique au cours du temps a été testée dans deux matrices différentes (milieu synthétique vin et milieu à 10 % éthanol) exposées ou non (enveloppées de

papier Aluminium) à la lumière du jour. Toutes les solutions testées étaient gardées à la température ambiante (25 à 28°C).

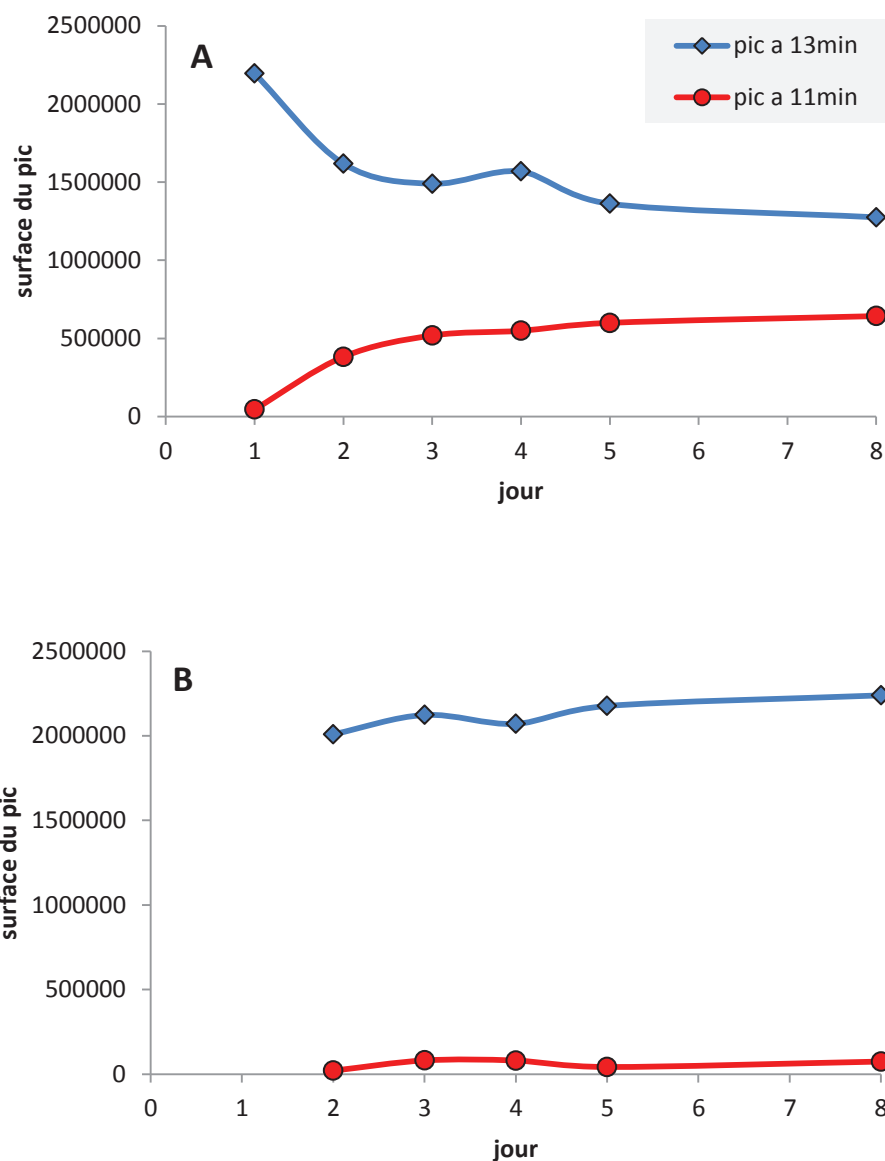


Figure 24. (A) acide *p*-coumarique stocké à la lumière du jour dans un milieu synthétique vin, (B) acide *p*-coumarique gardé à l'abri de la lumière dans un milieu synthétique vin.

Avec notre méthode d'analyse chromatographique, le temps de rétention de l'acide *p*-coumarique est de 13 min.

La **Figure 24** montre que les solutions exposées à la lumière (**A**) ont présenté une diminution de l'aire du pic initial de l'acide *p*-coumarique accompagnée de l'apparition d'un nouveau pic à un temps de rétention légèrement inférieur (11 min). Ce nouveau pic augmente en aire (en concentration) au cours du temps. Au contraire, les solutions gardées à l'abri de la lumière (**B**)

ont gardé la même aire sans apparition d'un second pic. Les résultats sont identiques lorsque la matrice est un milieu à 10 % éthanol.

Ce nouveau pic qui apparaît lors de l'exposition à la lumière pourrait être le pic d'un ester de l'acide ou l'isomère qui est difficilement détectable avec notre colonne.

Lorsque la matrice contenait du méthanol, Vončina *et al.* (2009) avaient montré que l'acide *p*-coumarique ainsi que l'acide férulique pouvaient subir une isomérisation partielle *trans-cis* à température ambiante et sous la lumière du jour. Cette isomérisation ne se produisait pas lorsque ces mêmes solutions étaient stockées à -18°C et à l'abri de la lumière.

Bien que les formes *cis* et *trans* des acides phénoliques sont des isomères géométriques avec des structures très similaires, ils peuvent être distingués par ordre d'élution lors de l'analyse par HPLC ; les isomères *cis* sont conservés plus longtemps que les isomères *trans*, autrement dit les isomères *cis* présentent un temps de rétention plus long.

Dans notre étude, cette hypothèse n'est pas vérifiée puisque le temps de rétention du pic qui apparaît en fonction du temps est inférieur au temps de rétention de l'acide *p*-coumarique. Ce changement s'effectue nettement entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour puis la diminution de la surface du pic initial se poursuit lentement jusqu'au 5^{ème} jour pour se stabiliser entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour. Concernant les valeurs, le nouveau pic du produit formé correspond en surface au quart de la surface du pic initial de l'acide *p*-coumarique.

En raison de la dissolution difficile et incomplète de l'acide *p*-coumarique dans l'eau, nous ne pourrions pas tester les expériences de stabilité dans une matrice à 100 % eau pour confirmer la nature du produit formé.

IV.3. Profils de croissance des souches provenant d'origines géographiques différentes

La **Figure 25** montre le profil de croissance des cinq souches utilisées dans cette étude. Le milieu d'étude est un milieu synthétique vin dont la composition est décrite dans le **Chapitre II**.

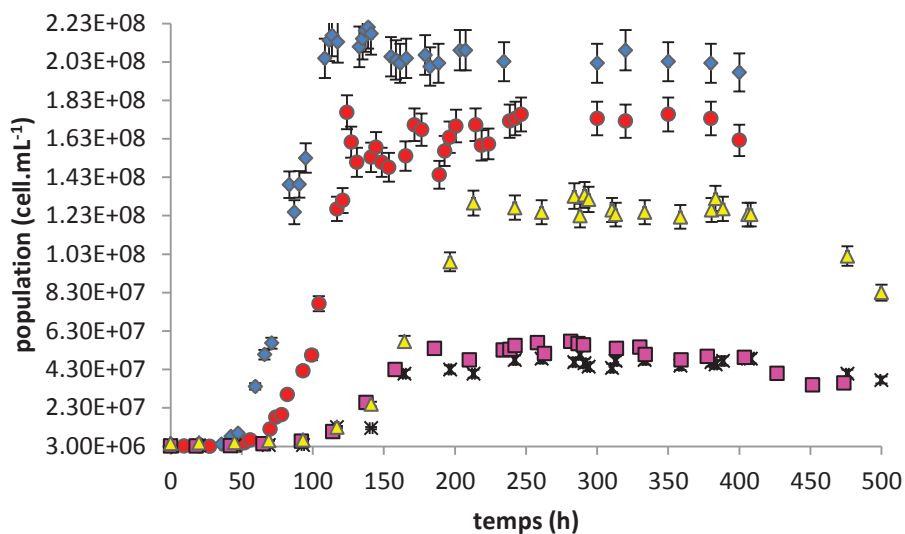


Figure 25. Evolution de la biomasse des 5 souches. (◇) souche F2, (○) souche F1, (△) souche L3, (□) souche L2 et (x) souche L1.

Les 2 souches françaises présentent les phases de latence les plus courtes (de 50 à 70 h), avec F2 plus rapide que F1, suivie d'une croissance exponentielle accélérée (de 30 à 50 h) et un état stationnaire qui commence à partir de 100 h. Le niveau de population maximum (en début de phase stationnaire) s'élève aux alentours de 2.10^8 levures.mL⁻¹ pour F2 et $1,75.10^8$ pour F1. Les souches libanaises L1 et L2 ont montré le même profil mais avec une croissance qui s'étale sur 100 h et une population maximum de 5.10^7 levures.mL⁻¹. La souche L3 présente un même profil mais avec une population maximale intermédiaire aux 2 souches françaises et aux 2 premières souches libanaises puisqu'il atteint les $1,32.10^8$ levures.mL⁻¹.

Tableau 18. Paramètres de la biomasse.

Paramètre	unité	Souches				
		F1	F2	L1	L2	L3
Durée de la phase de latence	h	70	48	93	93	93
Population maximale atteinte (X_{max}) (10^8)	levures.mL ⁻¹	1,75	2	0,5	0,57	1,32
Taux de croissance maximal (μ_{max}) (10^{-2})	h ⁻¹	15,2	15,3	8,22	8,33	8,69
Début de la phase stationnaire	h	112	131	186	186	213

Le taux de croissance maximal est différent pour chacune des souches. La valeur minimale correspond à la souche L1 et la maximale à la souche F2. Le **Tableau 18** résume les paramètres liés à l'évolution de la biomasse.

L'étude génétique avait montré pour les souches libanaises L1, L2 et L3, un profil de digestion enzymatique identique alors que le séquençage génétique avait différencié L3. Ces différences de groupes se retrouvent au niveau des cinétiques de biomasse : F1 et F2 assez proches, L1 et L2 identiques, et L3 formant ici un 3^{ème} groupe.

Barbin (2006) avait étudié les profils de croissance de plusieurs souches de *Brettanomyces* sur 1400 h et avait classé leur évolution selon 4 grands types de profils. Nos 5 courbes correspondent à l'allure du type I de Barbin (2006) avec 4 phases distinctes : latence, croissance exponentielle, phase stationnaire longue et déclin.

IV.4. Comparaison des cinétiques de bioconversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénols pour les 5 souches de *Brettanomyces bruxellensis*

Compte tenu de l'hypothèse émise par Salameh (2008) et qui affirme que le taux de conversion de l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol a systématiquement été de 100 % lorsque l'ajout a été fait en début de phase stationnaire et n'a pas dépassé les 75 % lorsque les ajouts étaient effectués en phase de croissance active ou en phase de latence, nous avons choisi de faire l'étude comparative des bioréactions dès le début de la phase stationnaire. Cette dernière présente deux avantages principaux : d'abord la population microbienne reste stable (arrêt de multiplication) et ensuite les profils différents de croissance ne sont pas pris en considération. Le seul paramètre qui va différer entre les souches sera le niveau de population. De plus, Tchobanov (2007) a montré que la vinylphénol réductase s'exprime plus intensément en phase stationnaire chez l'espèce *B. bruxellensis*.

Le choix des teneurs initiales en acide *p*-coumarique ajouté dans le milieu synthétique en début de phase stationnaire a été fixé en fonction des concentrations retrouvées dans le contexte œnologique. Dans le moût de raisin, cet acide peut atteindre 60 mg.L⁻¹ (Chatonnet *et al.*, 1997) mais ne dépasse pas les 8 mg.L⁻¹ dans le vin fini après clarification (Goldberg *et al.*, 1998).

IV.4.1. Problématique

La comparaison entre les cinétiques de la bioconversion des différentes souches peut apporter des données concernant la compréhension du mécanisme réactionnel permettant de convertir l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol. Nous essayerons de répondre aux questions suivantes :

Existe-t-il d'autres voies ou réactions possibles de disparition de l'acide *p*-coumarique autre que sa transformation en 4-éthylphénol ?

Y-a-t-il accumulation de l'un des réactifs ou produits dans le milieu intracellulaire ?

L'acide *p*-coumarique est-il capable de s'adsorber sur les parois des levures *Brettanomyces* ?

Pour répondre à ces questions, le bilan matière a été réalisé au cours des fermentations.

La bioconversion est une succession de deux réactions stœchiométriques équimolaires. Une mole d'acide *p*-coumarique est décarboxylée en une mole de 4-vinylphénol qui est ensuite réduite en une mole de 4-éthylphénol. Le suivi des concentrations molaires de ces trois constituants dans le milieu extracellulaire a été réalisé. Nous avons également additionné les concentrations des trois constituants ce qui permet d'avoir un bilan matière de la bioconversion :

- **Si cette somme est constante au cours du temps et égale à la quantité initiale d'acide *p*-coumarique ajouté (11 mg.L⁻¹ soit 0,067 mmol.L⁻¹), cela signifie qu'il n'y a pas d'accumulation de l'un ou des 3 constituants dans la cellule, ni de phénomènes d'adsorption sur les parois des levures et que cette réaction de bioconversion est la seule active par rapport à ces constituants.**
- **Si la somme diminue au cours du temps, cela signifie que un ou plusieurs des trois constituants participent à d'autres réactions ou qu'il y a accumulation à l'intérieur des cellules ou encore adsorption sur les parois.**

L'analyse des courbes et la vérification du bilan matière vont donc permettre de clarifier ces hypothèses.

IV.4.2. Profils cinétiques des fermentations

Chaque essai a été réalisé en triplicat. La reproductibilité étant bonne (**Figure 26**), une seule courbe moyenne pour chaque constituant analysé est représentée pour chaque souche dans la **Figure 27**.

Le temps 0 h correspond au début de la phase stationnaire, lorsque la population a terminé sa phase de croissance. Lors de ces essais, l'acide *trans-p*-coumarique est ajouté après 112 h du début de l'expérience de fermentation pour F1, 131 h pour F2, 186 h pour L1 et L2 et 213 h pour L3.

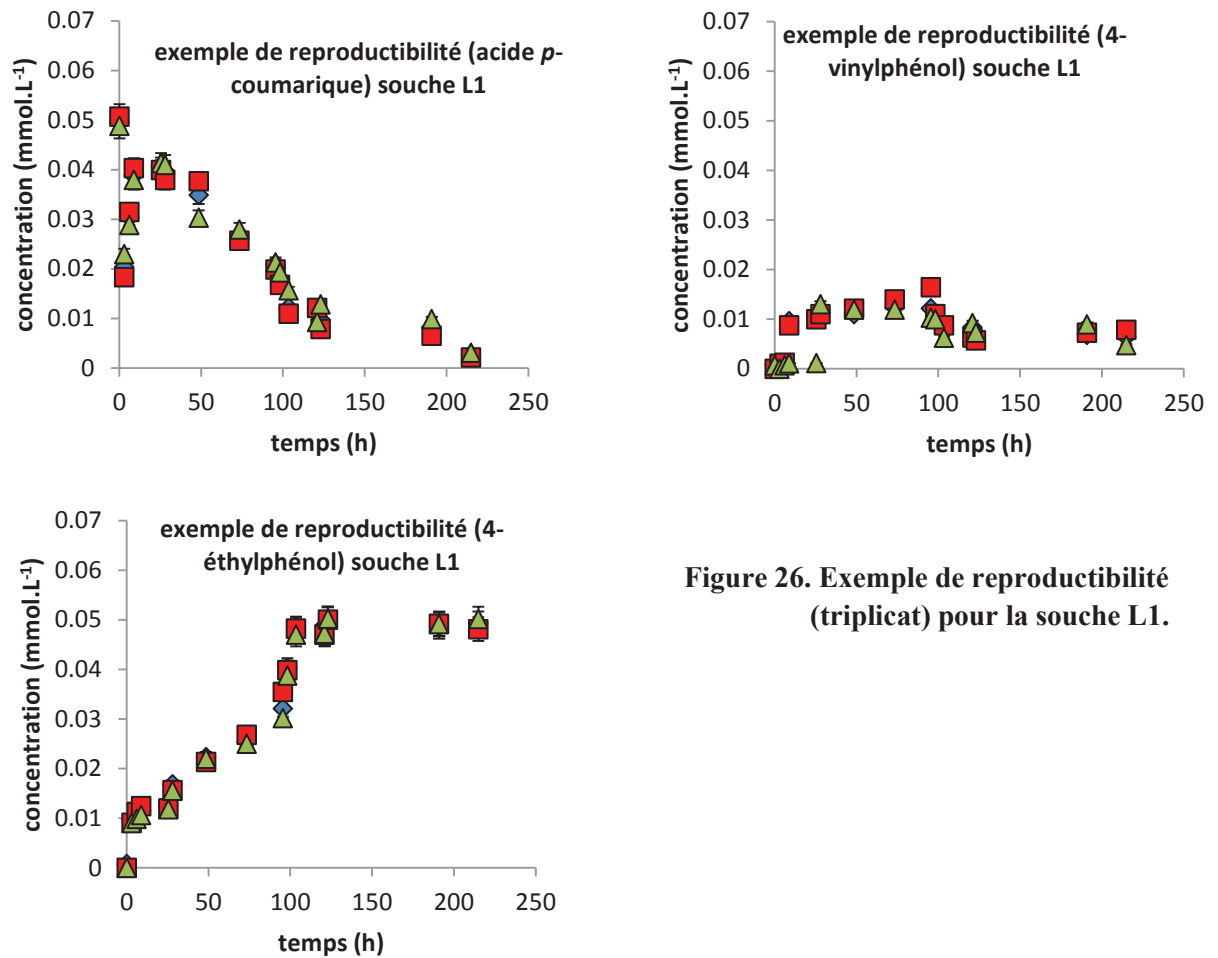
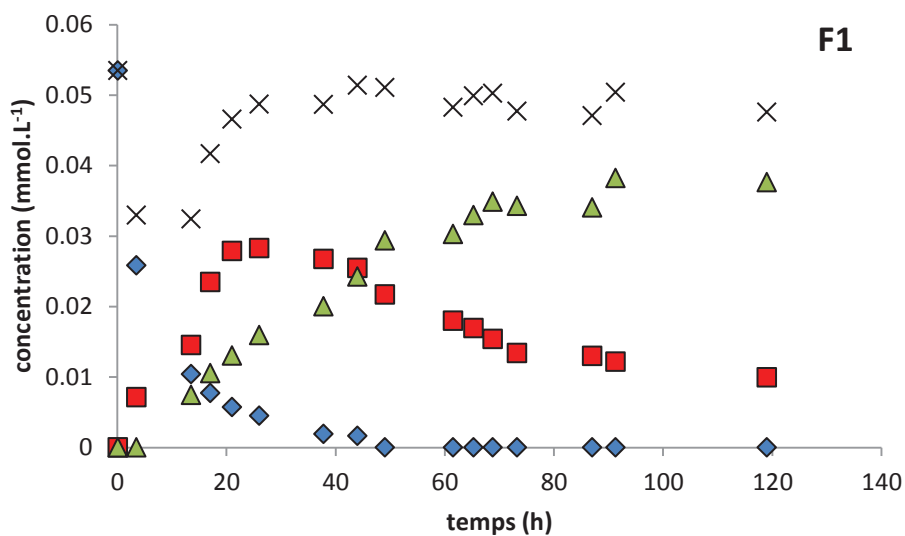
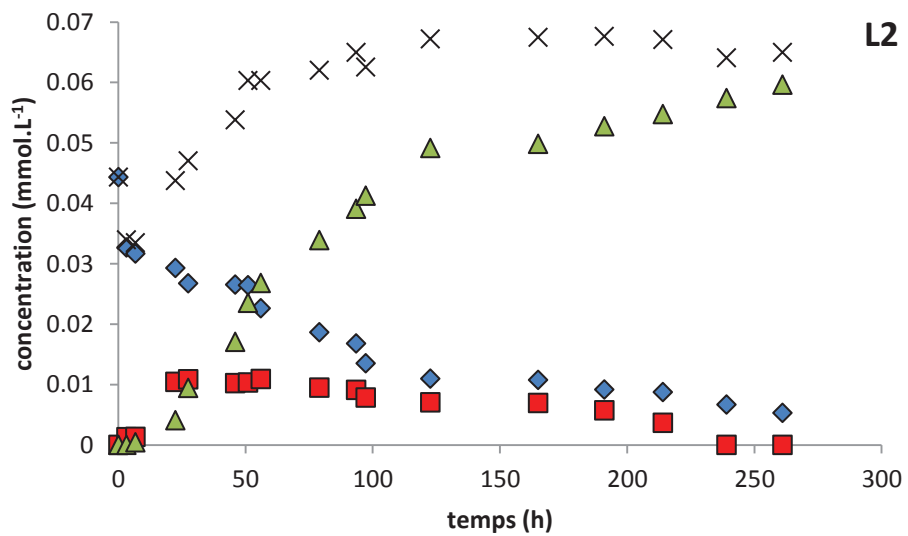
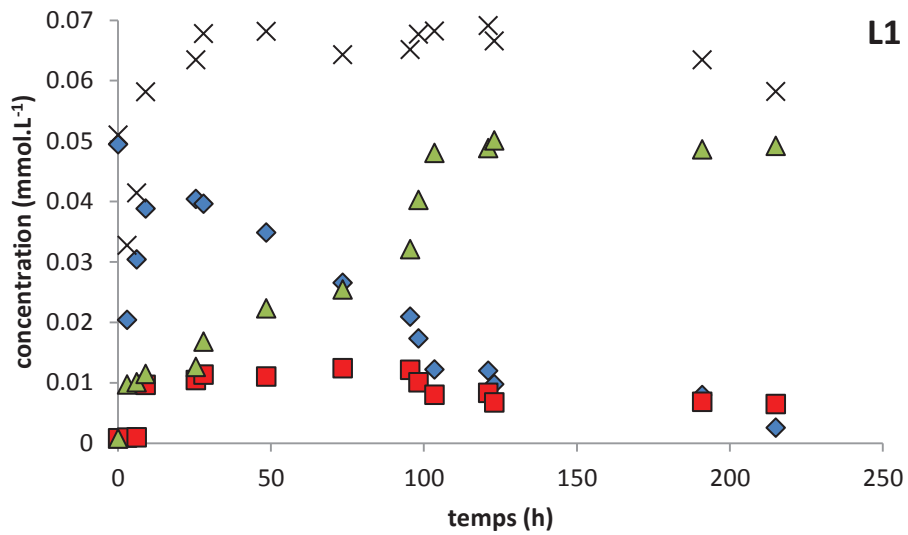
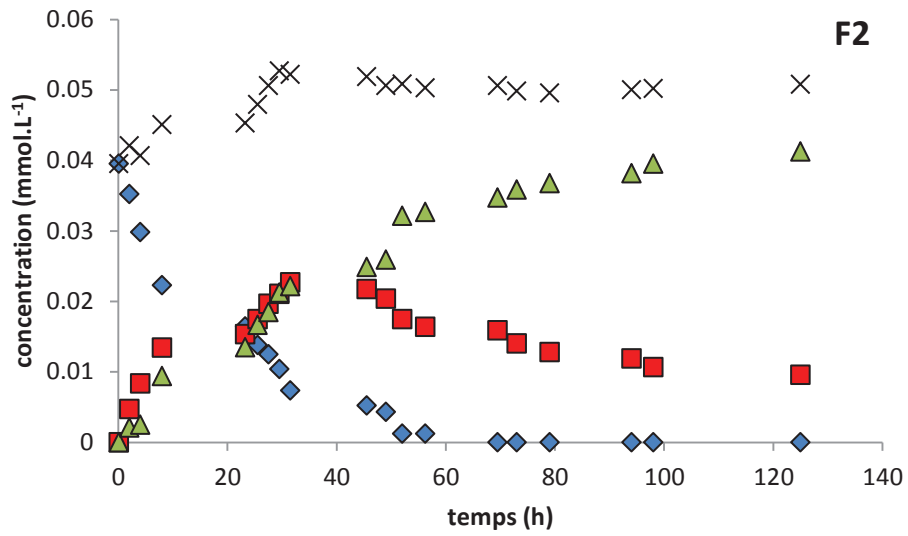


Figure 26. Exemple de reproductibilité (triplicat) pour la souche L1.

Les 5 courbes de la **Figure** suivante, relatives à chacune des souches, présentent le profil cinétique de bioconversion de l'acide *trans-p*-coumarique en 4-éthylphénols.

(◇) *trans-p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol, (x) bilan matière instantané





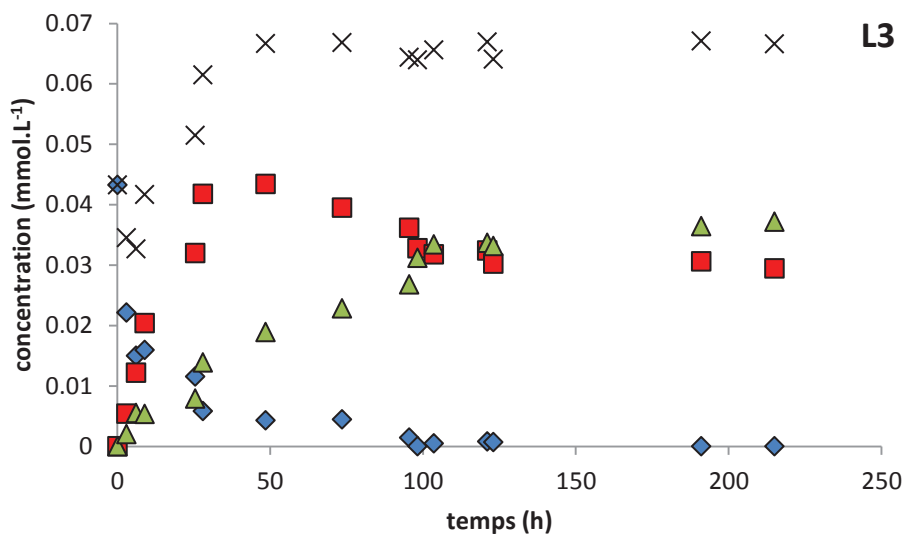


Figure 27. Profil cinétique de la bioconversion de l'acide *trans-p*-coumarique en 4-vinylphénol puis en 4-éthylphénol pour les 5 souches. (◇) *trans-p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol, (x) bilan matière instantané (somme des 3 constituants).

IV.4.3. Discussion sur le bilan matière instantané des fermentations

Pour les souches L1, L2 et L3, le bilan présente une chute initiale qui correspond soit à l'entrée rapide et l'accumulation de l'acide *p*-coumarique à l'intérieur de la cellule puisque l'enzyme HcD est connue pour effectuer son activité dans le milieu intracellulaire, soit à l'adsorption de l'acide sur les parois de *Brettanomyces*. Le pourcentage de disparition de l'acide directement après son ajout au milieu fermentaire varie entre 20 et 41 % selon les souches. La quantité théoriquement ajoutée n'a été retrouvée pour aucune d'entre elles. Pour les souches L1, L2 et L3, cette disparition rapide entraînant la chute du bilan matière est suivie d'une remontée de ce bilan qui revient rapidement au niveau ajouté initialement et correspondant à 0,067 mmol.L⁻¹. Chez ce type de levures, la stabilisation du bilan matière traduit l'absence d'accumulation de substrat à long terme dans le milieu intracellulaire ainsi que l'absence d'adsorption sur les parois des levures. D'autres voies chimiques capables de transformer l'un ou les trois constituants de cette réaction sont aussi à exclure. En terme de physiologie cellulaire, la membrane cytoplasmique des levures est composée de nombreux complexes protéiques tels que les protéases qui sont des enzymes responsables des transports de substances du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire et/ou avec ou sans transformation du substrat durant le passage. Chez nos souches, il semble que cette protéase

est active et effectue son travail au même moment où un substrat est ajouté au milieu extracellulaire.

De même, en début de réaction, les souches F1 et F2 présentent une chute du bilan matière liée vraisemblablement à l'accumulation initiale de l'acide *p*-coumarique dans la cellule ou à l'adsorption sur les parois des levures. La remontée et la stabilisation du bilan se fait comme pour les 3 souches L mais à un niveau plus bas (0,05 mmol.L⁻¹) que celui de la quantité ajoutée dans le milieu (0,067 mmol.L⁻¹). La différence de quantité peut être expliquée par deux hypothèses : soit par des phénomènes d'adsorption, soit par l'activation d'autres voies de transformation de l'acide *p*-coumarique. D'après les études de Salameh *et al.* (2008) et vu que le phénomène semble quasi instantané, il est cependant probable qu'il s'agisse d'adsorption sur les parois membranaires des levures. Les travaux récents de Cabrita *et al.* (2012) vont également dans le même sens avec une différence entre la concentration initiale introduite (10 mg.L⁻¹) des acides caféique, férulique et *p*-coumarique et la concentration détectée par HPLC dans plusieurs échantillons immédiatement après l'inoculation des levures. Ce phénomène a été observé chez les trois acides hydroxycinnamiques et pour d'autres souches de levures.

La comparaison des bilans matières finaux pour les 5 souches montrent donc une disparition de matière pour 3 d'entre elles : 29 % pour F1, 24 % pour F2 et 13 % pour L1. Les 3 % de L2 constituent une valeur très faible, de l'ordre de l'erreur expérimentale (**Tableau 19**). Cette disparition peut donc être vraisemblablement attribuée à de l'adsorption sur les parois des levures.

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des atomes ou des molécules (généralement nommés adsorbats) se fixent sur une surface solide (nommée adsorbant) selon divers processus plus ou moins intenses. En biologie, l'adsorption est la fixation à la surface d'une cellule. Le phénomène inverse, par lequel les molécules adsorbées sur la surface s'en détachent, se nomme la désorption ou le relargage.

Les propriétés adsorbantes des parois de levures sont connues et exploitées en œnologie surtout à travers l'emploi de dérivés de levures tels que les écorces. Leur intérêt œnologique est lié à l'élimination de produits secondaires de la fermentation alcoolique, comme les acides gras à chaîne moyenne (acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque). Aussi, il a été montré que les parois de cellules levuriennes sont capables d'adsorber différentes sortes de

constituants tels les esters, les phénols volatils (Chassagne *et al.*, 2005), les fongicides, des mycotoxines (Bejaoui *et al.*, 2004) et certains thiols volatils (Lavigne et Dubourdiou, 1996). Chez la levure, cette capacité d'adsorption dépend des réactions qui se font à son interface et certainement des propriétés physicochimiques ainsi que de la composition chimique de la paroi de la cellule. La température, le pourcentage en éthanol et le pH, qui sont des paramètres œnologiques classiques, peuvent également modifier les propriétés d'adsorption (Vasserot *et al.*, 1997). De plus, les propriétés de surface de la paroi de levure dépendent aussi de la souche, de l'espèce ou du genre levurien.

IV.4.4. Cinétiques de bioconversion

Pour la souche L3, la concentration de l'acide *p*-coumarique dans le milieu diminue rapidement entre 0-10 h puis continue à diminuer jusqu'à 100 h mais avec une pente plus faible. Les 4-vinylphénols et 4-éthylphénols sont produits entre 0-100 h pour se stabiliser à partir de 100 h, temps où la quantité d'acide disparaît du milieu. L'intermédiaire réactionnel, le 4-vinylphénol, n'a pas été transformé totalement, sa quantité (0,030 mmol.L⁻¹) ainsi que celle du 4-éthylphénol (0,037 mmol.L⁻¹) restant stable dans le milieu à partir de 100 h. L'enzyme vinylphénol réductase n'est donc plus active pour poursuivre la réduction du 4-vinylphénol.

Pour la souche L2, la quantité de l'acide diminue en début de réaction accompagnée d'une chute du bilan matière. Le produit intermédiaire est formé en faible quantité traduisant que l'action de la vinylphénol réductase est rapide par rapport à celle de la décarboxylase et qu'elle est capable de convertir toute la quantité de vinylphénol formée puisque sa concentration est nulle après 240 h.

La cinétique de la souche L1 ressemble à celle de la souche L2 ce qui va dans le sens des résultats de l'étude génétique qui n'a pu différencier ces 2 souches. La quantité finale de 4-vinylphénol est toutefois ici légèrement supérieure à 0 en fin d'expériences.

Les 2 souches françaises présentent un profil de bioconversion identique entre elles. L'acide disparaît complètement à partir de 50 h. Le 4-vinylphénol est formé en quantité importante (comme la souche L3) mais il est facilement réduit en 4-éthylphénol. Au bout de 120 h, une quantité de 4-vinylphénol est toujours présente dans le milieu extracellulaire et semble se stabiliser autour de 0,01 mmol.L⁻¹.

Le **Tableau 19** résume les différents paramètres caractérisant la réaction de bioconversion pour chaque souche.

Tableau 19. Paramètres cinétiques de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique pour 5 souches.

Paramètres cinétiques	Formule	Souches				
		F1	F2	L1	L2	L3
biomasse maximale (lev.mL ⁻¹) (10 ⁸)	X _{max}	1,75	2	0,5	0,57	1,32
vitesse de production de la biomasse (lev.mL ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁵)	rx=dX/dt	14,7	16,7	2,34	2,19	6,12
durée de la bioconversion (h)		119	125	215	261	215
quantité d'acide <i>p</i> -coumarique dosée initialement (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)		53	39	51	44	43
quantité finale d'acide <i>p</i> -coumarique (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻⁴)		0	0	25	53	0
quantité finale de 4-VP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻⁴)		99	95	64	0	29
quantité finale de 4-EP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)		37	41	49	59	37
quantité finale de bilan matière (10 ⁻³)		47	50	58	65	66
vitesse spécifique de consommation de l'acide <i>p</i> -coumarique (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	V _s = -1/X*(dS/dt)	3,22	2,56	5,92	4,10	2,36
vitesse spécifique de production de 4-EP (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	V _p =1/X*(dP/dt)	1,81	1,58	4,51	3,96	1,31
Pourcentage d'acide disparu initialement (%)	AD=[100-(quantité détectée/0,067)*100]	20	41	24	34	34
Taux de conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique (%)	T=[(S _f -S ₀)/S ₀]*100	100	100	96	92	100
Rendement global en produit (%)	RG=[(P _f -P ₀)/(S ₀ -S _f)]*100	56	62	76	97	55
Disparition de matière (%)	D=[100-(bilan matière final/0,067)*100]	29	24	13	3	0
Rendement en produit (%)	R=[(P _f -P ₀)/(bilan matière final)]*100	79	81	85	92	55

Le **Tableau 19** montre que les souches F1, F2 et L3 ont consommé toute la quantité d'acide *p*-coumarique ajouté (taux de conversion de 100 %) alors que pour L1 et L2, une concentration résiduelle est mesurée dans le milieu extracellulaire (96 % et 92 % de taux de conversion) et ce malgré une durée plus longue d'expérimentation. A ce sujet, les fermentations ont été stoppées lorsque le taux de mortalité commençait à augmenter et que l'état physiologique des levures changeait (rétrécissement).

En ce qui concernent les vitesses spécifiques, que ce soit vitesse spécifique de consommation ou de production, L1 présente les plus grandes valeurs suivie successivement de L2, F1, F2 et L3. Les rapports entre les vitesses spécifiques les plus grandes et les plus faibles sont de 2,3 pour la consommation de l'acide et de 3,4 pour celle de production de 4-éthylphénol. Ces

rapports élevés montrent la diversité des vitesses de bioconversion pour les souches. Remarquons que les valeurs les plus élevées correspondent aux souches qui ne présentent pas de chute de bilan matière (L1 et L2) c'est à dire celles qui sont soupçonnées de ne pas entrainer des phénomènes d'adsorption sur leur parois. Une piste sera peut-être à poursuivre dans ce sens. Au final, deux types de rendements en production de 4-éthylphénol peuvent être calculés : 1 par rapport aux 0,067 mmol.L⁻¹ d'acide *p*-coumarique total introduit (rendement global (RG) du **Tableau 19**), l'autre par rapport à l'acide *p*-coumarique disponible (rendement (R) du **Tableau 19**) qui est variable selon les souches. Les différences d'« efficacité » des souches apparaissent alors clairement puisque les rendements varient de 92 % pour L2 à 55 % pour L3.

IV.4.5. Conclusions

De cette série d'expériences, nous pouvons conclure que:

- **Les mêmes 3 groupes déterminés lors de l'identification génétique peuvent être formés pour le comportement physiologique: L1 et L2, F1 et F2, L3.**
- **La diminution du bilan matière pourrait s'expliquer par l'adsorption d'acide *p*-coumarique sur les parois des levures *Brettanomyces*. Ce phénomène semble être souche-dépendant avec des valeurs allant de 0 à 29 % d'acide adsorbé.**
- **L'acide *p*-coumarique non adsorbé est totalement converti en 4-vinylphénols pour 3 des souches testées, les 2 autres atteignant des valeurs résiduelles faibles. L'activité de l'enzyme hydroxycinnamate décarboxylase ne semble pas être limitante dans ces conditions même si les vitesses spécifiques de consommation sont elles aussi variables entre souches.**
- **Au contraire, l'enzyme vinylphénol réductase semble être limitante pour l'obtention de 4-éthylphénols. Les vitesses spécifiques de consommation et de production sont différentes et surtout les rendements de transformation de l'acide disponible (le non adsorbé) varient de 55 à 92 %.**

IV.5. Bioconversion de l'isomère *cis-p*-coumarique par *Brettanomyces bruxellensis*

Toutes les études (les nôtres mais aussi dans la bibliographie) de bioconversion ont été réalisées sur l'acide *trans-p*-coumarique en raison de l'absence du standard *cis* sur le marché comme on l'a vu dans l'aperçu bibliographique (**Chapitre I**). Nous avons pu nous procurer cet isomère sur demande (de Chemos GmbH - 93128 Regenstauf, Allemagne) (**Figure 28**).

Cependant, après un certain temps de stockage, il est apparu que ce produit était instable. La probabilité qu'il ait subi une isomérisation « *cis* → *trans* » est grande puisque, après 2 mois de stockage, les mêmes résultats que les essais avec le *trans* ont été obtenus. Avant cela, les essais avec les souches L1 et F2 avaient pu être réalisés mais pas avec les 3 autres souches.

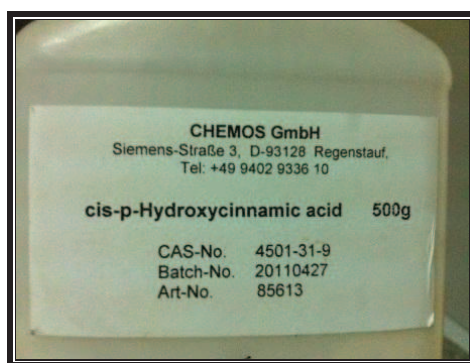


Figure 28. Isomère « *cis* » de l'acide *p*-coumarique synthétisé sur demande de Chemos GmbH.

En premier lieu, pour ces 2 souches, nous avons comparé son comportement vis-à-vis de l'isomère *trans* qui est habituellement utilisé dans les essais de la bibliographie. Les résultats sont montrés dans la **Figure 29**. Il s'agit d'un profil comparatif de 2 expériences différentes réalisées en parallèle l'une montrant la consommation de l'acide *trans-p*-coumarique et l'autre de l'isomère *cis* pour chaque souche.

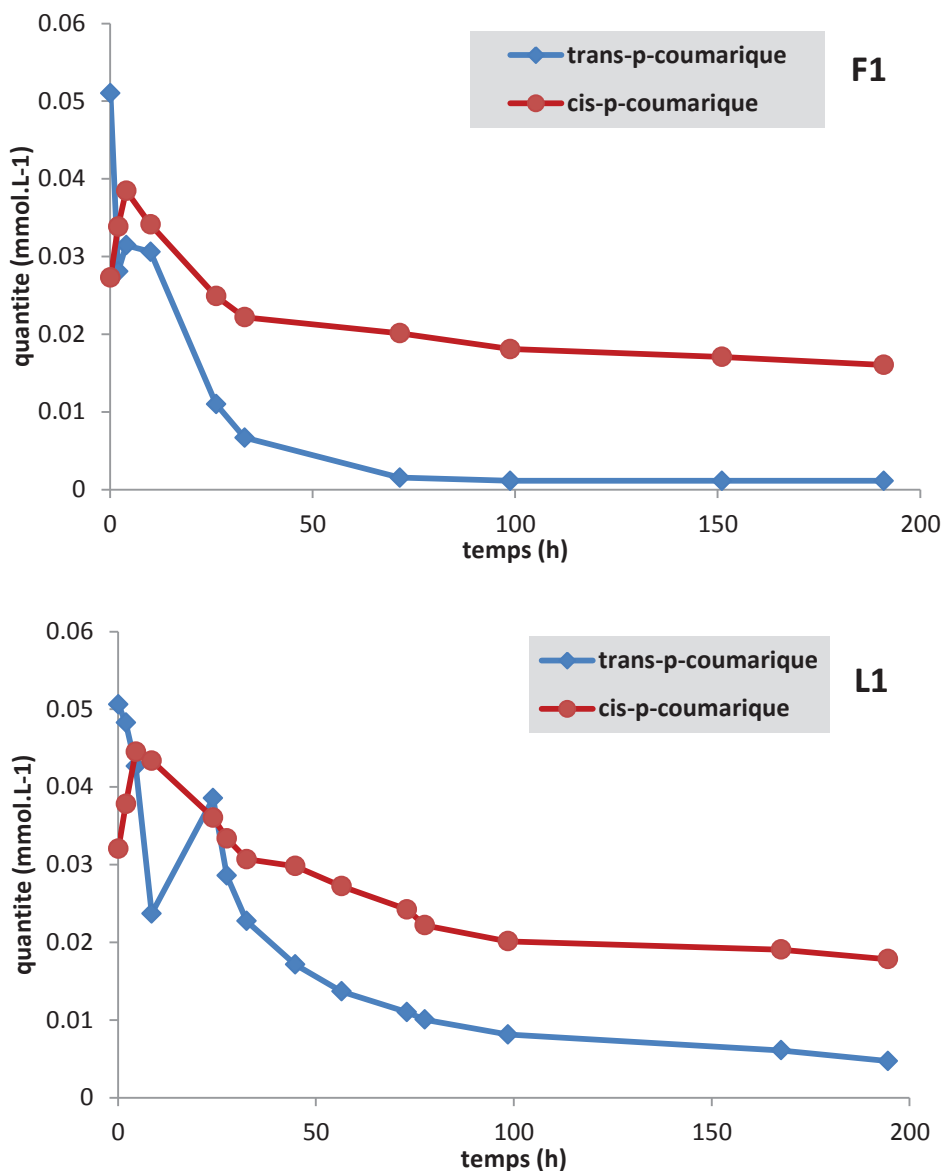


Figure 29. Comparaison de la quantité d'acide *p*-coumarique consommée entre deux souches de *Brettanomyces bruxellensis* vis-à-vis des isomères de l'acide *p*-coumarique. (◇) *trans-p*-coumarique, (○) *cis-p*-coumarique.

La quantité d'acide ajoutée ($0,067 \text{ mmol.L}^{-1}$) en début de réaction n'est jamais retrouvée. Pour l'isomère *cis*, elle est encore plus faible. Le pourcentage disparu arrive jusqu'à 60 % pour F1 et 52 % pour L1 alors que ce même pourcentage était de 20 et 24 % pour F1 et L1, respectivement avec l'isomère *trans*. Cette quantité subit une faible remontée liée probablement à la sortie rapide de l'acide vers le milieu extracellulaire ou aux phénomènes de désorption (relargage) de la quantité probablement adsorbée sur les parois des levures. Les

souches de *Brettanomyces* consomment moins rapidement cet isomère. La cinétique de bioconversion est représentée dans la **Figure 30** pour les 2 souches testées.

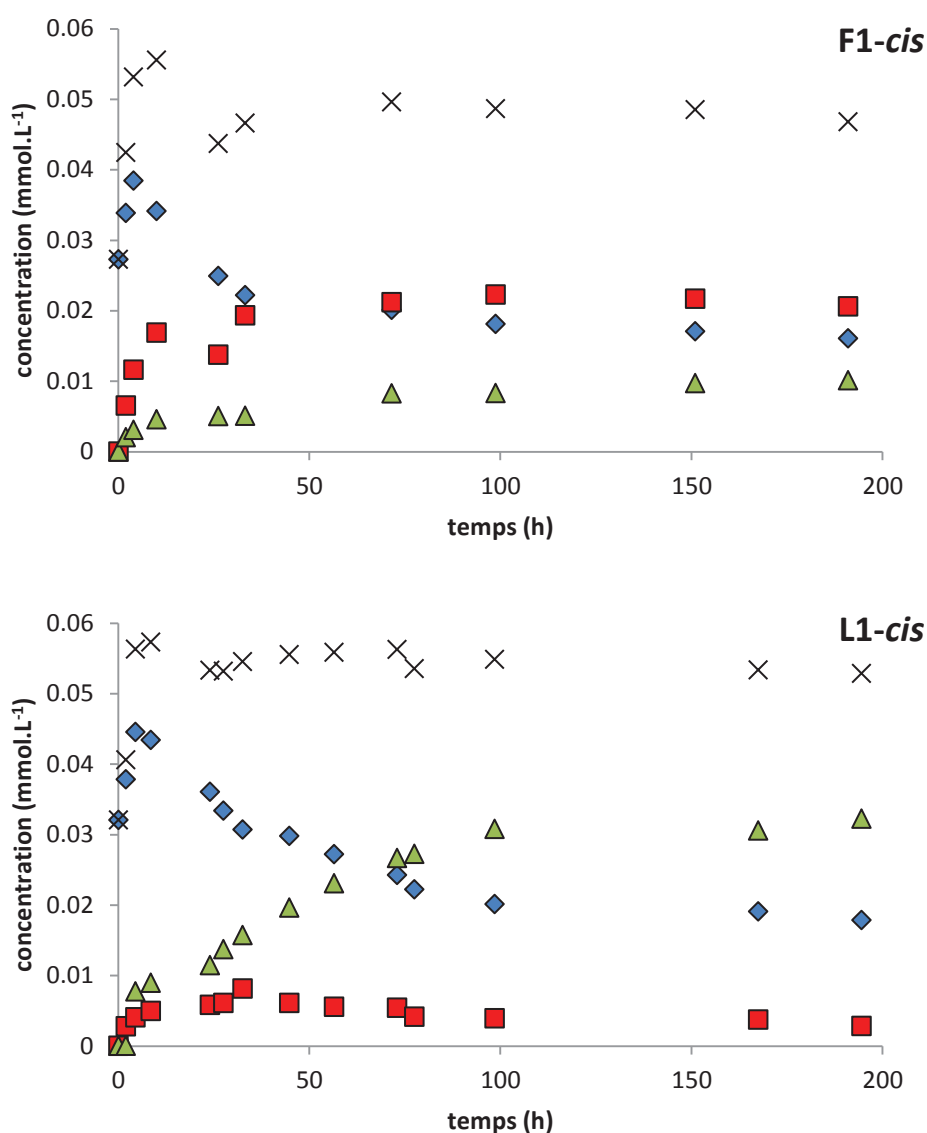


Figure 30. Bioconversion de l'acide *cis-p*-coumarique par les souches F1 et L1. (◇) acide *cis-p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (△) 4-éthylphénol, (x) bilan matière.

La comparaison des bioconversions des 2 isomères (cf. **Figure 27** pour le *trans*) montre que la réaction avec le *cis* est ralentie étant donné que le *trans* disparaît complètement à partir de 50 h alors qu'il reste pour le *cis* une quantité de 0,017 mmol.L⁻¹ après 200 h (cas de F1). De même, la quantité de 4-éthylphénol produite par F1 est de 0,037 mmol.L⁻¹ après 120 h avec le *trans* alors qu'elle n'est que de 0,01 mmol.L⁻¹ dans le cas du *cis*. Les mêmes phénomènes de ralentissement de la bioconversion avec le *trans* sont observés avec L1. Concernant le bilan

matière, il se stabilise à 0,047 mmol.L⁻¹ pour F1 et à 0,052 mmol.L⁻¹ pour L1. La comparaison entre les 2 isomères apparaît clairement dans le **Tableau 20**.

Tableau 20. Comparaison des quantités de constituants pour les bioconversions avec les 2 isomères de l'acide *p*-coumarique.

Paramètres cinétiques	<i>Cis</i>		<i>Trans</i>	
	F1	L1	F1	L1
quantité d'acide <i>p</i> -coumarique détectée initialement (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	27	32	53	51
quantité finale d'acide <i>p</i> -coumarique (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	16	18	0	2,5
quantité finale de 4-VP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	2	0,28	0,99	0,64
quantité finale de 4-EP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	10	32	37	49
quantité finale de bilan matière (10 ⁻³)	46	53	47	58
vitesse spécifique de consommation de l'acide <i>p</i> -coumarique (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	1,52	4,98	3,22	5,92
vitesse spécifique de production de 4-EP (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	0,29	3,26	1,81	4,51
Pourcentage d'acide disparu initialement (%)	60	52	20	24
Taux de conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique (%)	76	73	100	96
Rendement global en produit (%)	20	65	56	76
Disparition de matière (%)	30	21	29	13
Rendement en produit (%)	21	61	79	85

Quelle que soit la levure, l'acide *cis* est donc moins converti que le *trans*. Son entrée dans la cellule ou sa décarboxylation par l'enzyme hydroxycinnamate décarboxylase se fait moins bien. Pour la souche F1, l'étape liée à l'activité de l'enzyme réductase se fait également moins bien que dans le cas où l'acide *cis* a été introduit (rendement de 21 % contre 79 %). De même, chez L1, le rendement en produit est plus faible dans le cas du *cis* (rendement de 61 % contre 85 %).

Comme on l'a déjà vu dans le **Chapitre I**, il n'existe pas d'études antérieures réalisées sur cet isomère. La littérature signale juste sa présence dans le vin tout en évoquant sa concentration qui est toujours inférieure à la forme *trans*. Les travaux de Fernández de Simón *et al.* (2002) comparent les concentrations de composés phénoliques entre des vins âgés dans des fûts d'origine espagnoles, françaises et américaines. Il est apparu que le *trans* était toujours présent en quantité plus élevée indépendamment de l'origine des fûts. Les valeurs étaient de 2,44 mg.L⁻¹ pour le *trans* contre 0,14 pour le *cis* et parfois ce dernier n'était pas détectable dans la majorité des vins testés lors de cette étude et présents dans des fûts espagnols. De même, dans des fûts français, les valeurs étaient de 2,69 pour le *trans* contre 0,18 pour le *cis*

et de 2,27 contre 0,47 dans des fûts américains. Dans les travaux de Hernández *et al.* (2006), la concentration de l'acide *trans-p*-coumarique était de 0,7 mg.L⁻¹ et celle du *cis* 0,85 avant la fermentation malolactique alors que ces valeurs s'élèvent à 21,34 et 7,19 respectivement après la fermentation malolactique lors du stockage des vins dans des réservoirs en acier inoxydable et à 17,82 et 8,47 lorsqu'ils sont gardés en barrique.

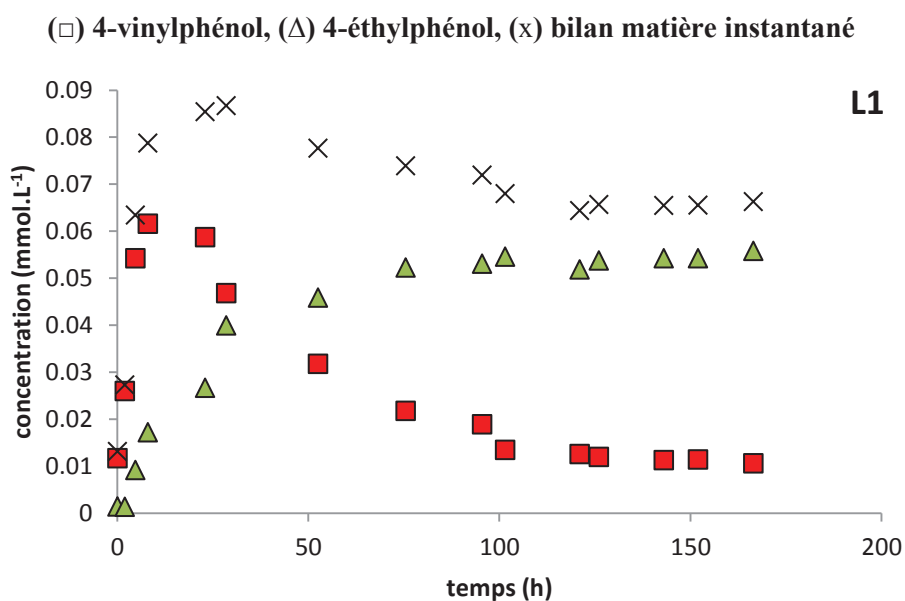
IV.6. Comparaison des cinétiques de bioconversion du 4-vinylphénol comme substrat initial pour les 5 souches de *B. bruxellensis*

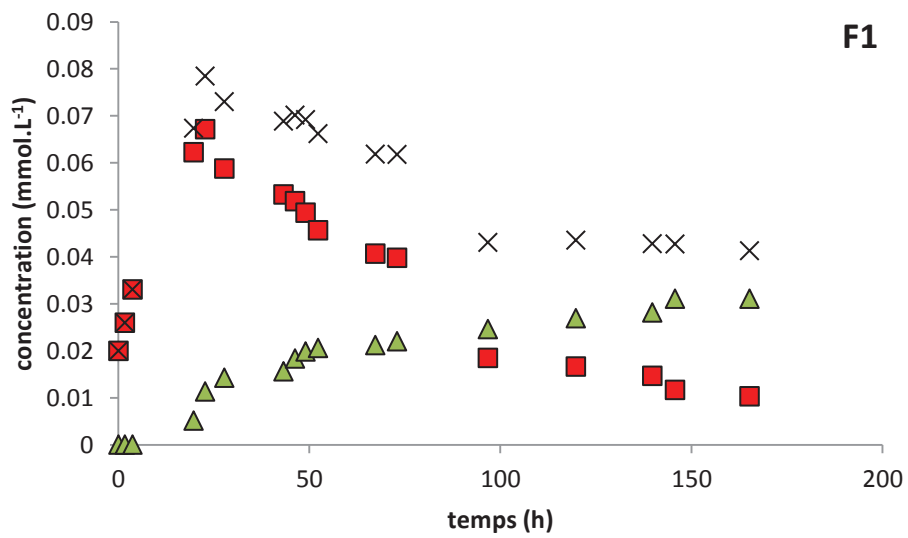
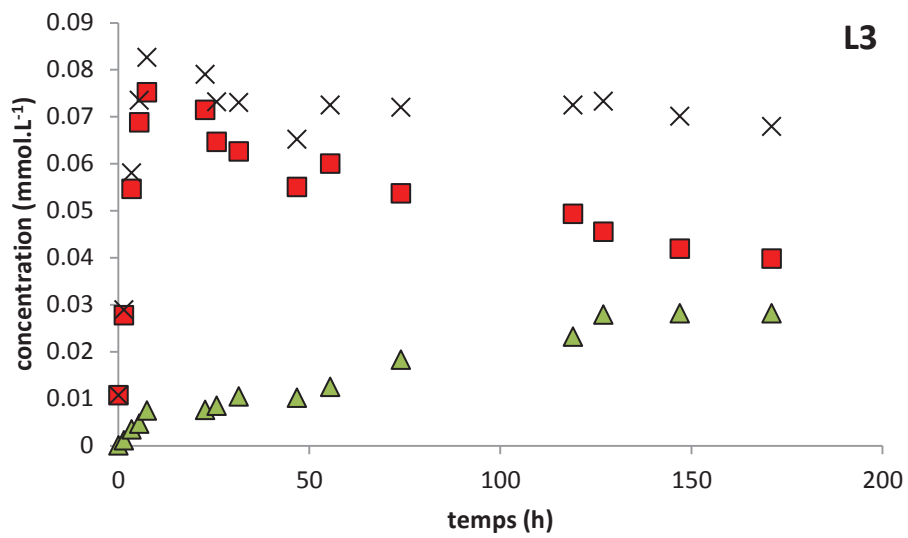
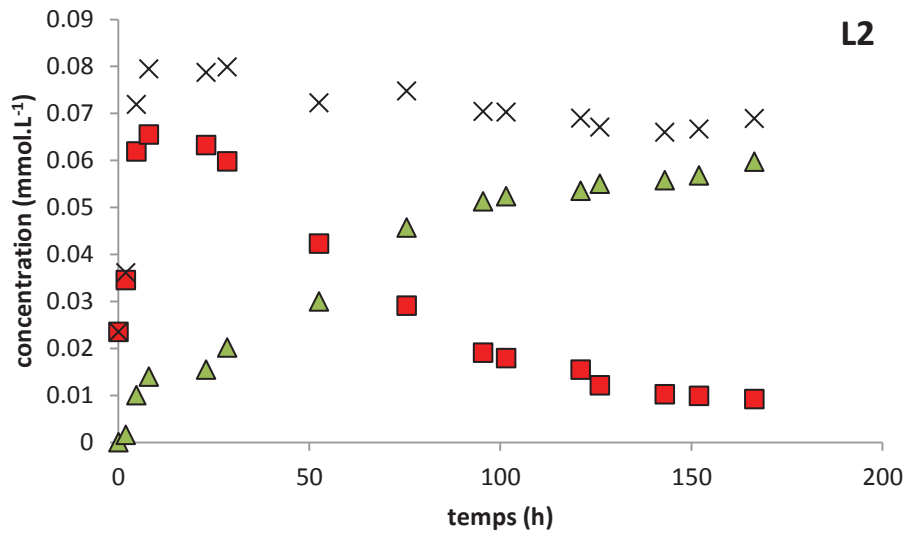
IV.6.1. Introduction

Les expériences réalisées avec ajout de 4-vinylphénol à la place d'acide *p*-coumarique ont pour but de s'intéresser à la seconde partie de la réaction où la réductase est active, en s'affranchissant de l'activité de la décarboxylase. De plus, elles doivent nous permettre de tester l'adsorption de ce composé sur les parois des levures.

Le 4-vinylphénol n'est commercialisé que sous forme de solution à 10 % de propylène glycol. Pour pouvoir comparer avec les expériences précédentes, nous avons choisi de l'ajouter à une concentration de 10 mg.L⁻¹ (correspondant à 0,0818 mmol.L⁻¹) en absence d'acide *p*-coumarique et en début de phase stationnaire. Cependant, du fait de son conditionnement dans le propylène glycol, l'effet sur la population et sur la bioréaction peut être biaisé.

Le profil de bioconversion du 4-vinylphénol par les cinq souches de *B. bruxellensis* est décrit dans la **Figure 31**.





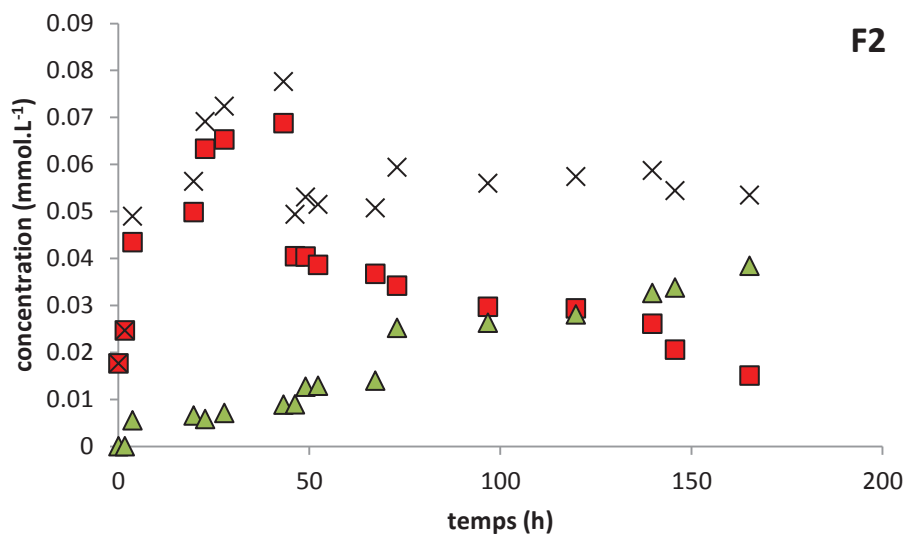


Figure 31. Profil cinétique de la bioconversion du 4-vinylphénol en 4-éthylphénol pour les 5 souches de *B. bruxellensis*. (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol, (x) bilan matière.

IV.6.2. Discussion du bilan matière

Les 0,0818 mmol.L⁻¹ de 4-vinylphénol ajoutés ne sont jamais retrouvés sur le début de l'expérience. Pour toutes les souches, la quantité initiale de 4-vinylphénol démarre d'une valeur très faible pour augmenter au cours des 10-20 premières heures et atteindre approximativement la valeur introduite de 0,0818 mmol.L⁻¹. L'explication de ce phénomène semble être complexe mais comme pour les expériences avec ajout d'acide *p*-coumarique, les hypothèses suivantes peuvent être envisagées pour expliquer cette disparition rapide de la quantité initiale de réactif introduite:

- **Adsorption instantanée d'une grande partie des 4-vinylphénols sur les parois des levures suivie d'une désorption assez rapide (20 à 30 h).**
- **Absorption ou accumulation rapide intracellulaire des 4-vinylphénols puis sortie vers le milieu extracellulaire.**

Par la suite, contrairement à ce qui a été observé avec l'ajout d'acide *p*-coumarique (*cis* ou *trans*), le bilan matière ne se stabilise pas immédiatement mais diminue pour rester constant après 50 à 100 h de fermentation. Pour les souches L1, L2 et L3, la stabilisation se fait aux alentours de 0,07 mmol.L⁻¹ ce qui représente une perte de moins de 20 %.

En ce qui concernent les 2 souches F1 et F2, la chute du bilan matière est bien plus marqué puisqu'il se stabilise à 0,04 mmol.L⁻¹ pour F1 et 0,05 mmol.L⁻¹ pour F2 (50 % et 35 % de pertes) (**Tableau 21**).

Les mêmes hypothèses évoquées précédemment pour l'acide *p*-coumarique peuvent être reprises à savoir l'adsorption de ces composés sur les parois des levures ou l'accumulation intracellulaire d'un des constituants. Cependant, le phénomène n'étant pas aussi instantané que pour l'acide *p*-coumarique, l'hypothèse d'une dégradation des 4-vinylphénols par une autre voie ne peut être exclue.

Si pour l'acide *p*-coumarique le caractère instantané de la chute du bilan matière, le fait qu'il restait ensuite constant tout au long de l'expérience et les travaux notamment de Salameh (2008) étaient autant d'indices faisant penser à de l'adsorption, ici il est plus difficile de trancher entre ces 3 hypothèses. En effet, dans ces expériences, la chute du bilan matière ne se stabilise qu'aux alentours de 80-100 h.

Notons toutefois, que comme pour le bilan matière avec les essais avec ajout d'acide *p*-coumarique, ce sont les souches F1 et F2 qui occasionnent les chutes les plus importantes. Devons-nous y voir une faculté d'adsorption plus importante de ces levures par rapport aux souches L1, L2 et L3 ?

IV.6.3. Aspects cinétiques des courbes

Pour les cinq courbes présentées dans la **Figure 31**, seule une quantité faible, par rapport à la quantité théorique de 4-vinylphénol ajouté, est présente dans le milieu extracellulaire et augmente progressivement au même moment où du 4-éthylphénol commence à se former. Cette augmentation est suivie d'un profil classique de transformation traduit par la réduction du 4-vinylphénol suivie de la formation du 4-éthylphénol.

Les profils de L1 et L2 sont identiques. La quantité de produit formé est la plus importante pour ces deux souches. Dans le cas de L3, les résultats sont semblables à la bioconversion où l'acide *p*-coumarique était le réactif initial. La quantité de 4-vinylphénol diminue faiblement à partir de 120 h et la quantité de 4-éthylphénol formée se stabilise. Nous reprenons l'hypothèse proposée précédemment : la vinylphénol réductase chez la souche L3 n'est pas suffisamment active pour poursuivre la bioréaction. Elle se trouve inhibée après un certain temps.

Pour les souches F1 et F2, les niveaux de 4-éthylphénols et les niveaux du bilan matière sont plus bas que ceux de L1 et L2 (**Figure 31**). La disparition du 4-vinylphénol du milieu extracellulaire pourrait être expliquée par les phénomènes d'adsorption de ce réactif sur les parois des levures. Les souches françaises possèdent alors la capacité d'adsorber le 4-vinylphénol comme l'acide *p*-coumarique. Cette capacité d'adsorption n'est pas liée à la nature du produit adsorbé mais peut être dépendante de la composition de la paroi levurienne jouant le rôle d'adsorbant. Dans le contexte œnologique, la capacité d'adsorption de *Brettanomyces* est utilisée pour lutter contre sa présence et son altération. En effet, *Brettanomyces* est capable d'adsorber le chitosane qui bloque les transferts entre les milieux intra- et extracellulaires favorisant l'action biologique létale tout en permettant la sédimentation et l'élimination de ces levures d'altération.

Dans les cinq cas, le 4-vinylphénol ne disparaît pas complètement du milieu et la bioconversion demeure inachevée. Les différents paramètres sont présentés dans le **Tableau 21**.

Tableau 21. Paramètres cinétiques de la bioconversion du 4-vinylphénol pour les 5 souches.

Paramètres cinétiques	Souches				
	F1	F2	L1	L2	L3
quantité finale de 4-VP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	10	15	10	0,91	39
quantité finale de 4-EP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	31	38	55	59	28
quantité finale de bilan matière (10 ⁻³)	41	53	66	68	67
vitesse spécifique de consommation de 4-VP (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	2,47	1,93	8,45	7,57	1,86
vitesse spécifique de production de 4-EP (mol.lev ⁻¹ .h ⁻¹) (10 ⁻¹²)	1,07	1,11	6,60	6,22	1,24
Taux de conversion du 4-VP (%)	87	81	87	88	51
Rendement global en 4-EP (%)	43	57	78	82	67
Disparition de matière (%)	50	35	19	16	18
Rendement en 4-EP (%)	75	71	84	87	41

Le **Tableau 21** montre qu'aucune des souches n'est capable de consommer tout le 4-vinylphénol. Les taux de conversion se ressemblent pour les 4 souches (entre 81 et 88 %) mais reste différent pour L3 avec un pourcentage assez faible (51 %).

Que ce soit vitesses de consommation du 4-vinylphénol ou vitesses de production du 4-éthylphénol, les valeurs sont du même ordre pour le couple de souches L1 et L2 d'une part et F1, F2 et L3 d'autre part. Les rapports entre les vitesses spécifiques les plus grandes et les plus faibles sont de 4,5 pour la consommation de l'acide et de 6,15 pour celles de production de 4-éthylphénol. Ces rapports sont encore plus élevés en comparant avec l'expérience où l'acide *trans-p*-coumarique était le réactif initial. Ceci confirme la diversité des vitesses de bioconversion liée à la diversité de souches.

Deux types de rendements en production de 4-éthylphénol peuvent être calculés : l'un par rapport aux 0,0818 mmol.L⁻¹ de 4-vinylphénol total introduit (RG du **Tableau 21**), l'autre par rapport au 4-vinylphénol disponible (R du **Tableau 21**) qui est variable selon les souches. Les valeurs les plus élevées sont pour L2 qui a aussi montré les rendements les plus importants dans le cas de la bioconversion de l'acide *trans-p*-coumarique. Ces taux et ces rendements sont plus faibles que ceux obtenus lors de la bioconversion de l'acide *trans-p*-coumarique. Ceci nous laisse penser que la présence initiale du 4-vinylphénol commercialisé ralentit la bioconversion. Comme nous l'avons dit, le propylène glycol dans lequel le 4-vinylphénol a été dilué pourrait avoir un effet sur les activités enzymatiques.

La valeur de R la plus basse reste pour L3. Ceci paraît normal en raison de l'inhibition de l'activité de l'enzyme VPR.

IV.6.4. Conclusions

De cette série d'expériences, nous pouvons conclure par quelques hypothèses importantes :

- **La quantité de 4-vinylphénol ajouté n'est jamais retrouvée en début de réaction et induit une chute initiale du bilan matière. Un phénomène complexe se produit puisqu'elle réapparaît progressivement en fonction du temps.**
- **Nos souches pourraient posséder la capacité d'adsorber le 4-vinylphénol comme l'acide *p*-coumarique. Nos résultats ont montré que cette capacité d'adsorption n'était pas liée à la nature du produit adsorbé (acide ou 4-vinylphénol) mais à la composition de la paroi cellulaire jouant le rôle d'adsorbant. Cette constatation reste une hypothèse et la variabilité des multiples souches de *Brettanomyces***

isolées dans le monde pourraient toujours montrer des résultats complètement différents. La capacité d'adsorption demeure souche-dépendante.

- Les taux de conversion du 4-vinylphénol et les rendements en 4-éthylphénol sont plus faibles que ceux obtenus lors de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique. Le propylène dans lequel était conditionné le 4-vinylphénol ajouté pourrait avoir un effet ralentissant sur le déroulement de l'activité enzymatique de la 4-vinylphénol réductase.

Chapitre V

Influence des paramètres du milieu et du niveau de population sur la production de 4-éthylphénol

V.1. Influence de la concentration en ammonium et du sulfate de magnésium sur la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* et sur la production de 4-éthylphénol

Peu de travaux s'intéressent à l'impact de compléments nutritionnels sur le développement de *Brettanomyces* et la production de phénols volatils. Cette partie est consacrée à l'étude de l'influence des différentes concentrations de sulfate d'ammonium et d'autres sources fournissant l'azote ou non sur ces deux paramètres.

V.1.1. Effet d'ions minéraux et du magnésium sur la croissance de *Brettanomyces*

Le **Tableau 22** regroupe les concentrations testées pour chaque composé. Les expériences de cette partie ont été réalisées sur la seule souche F1.

Tableau 22. Les concentrations testées pour chaque composé.

	concentration testée (mg.L ⁻¹)							
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0,25	0,5	1	2	3	6	10
MgSO ₄	0,5							
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5							

Le MSV contient 0,5 g.L⁻¹ de sulfate d'ammonium (SA) (NH₄)₂SO₄. Le SA est susceptible de donner en solution les ions ammonium (NH₄⁺) et les ions sulfate (SO₄²⁻). Afin d'évaluer le rôle de chacun de ses ions sur la croissance de *Brettanomyces* d'une part, et sur la bioconversion d'autre part, nous avons choisi de réaliser deux fermentations avec chaque fois une source différente remplaçant le SA et une troisième sans SA. Le sulfate de magnésium MgSO₄ sera la source qui fournit l'ion SO₄²⁻ alors que l'hydrogénophosphate de diammonium (NH₄)₂HPO₄ sera la source qui fournit l'ion NH₄⁺. Dans les deux derniers cas, la concentration ajoutée est de 0,5 g.L⁻¹.

Le profil de croissance est représenté dans la **Figure 32**.

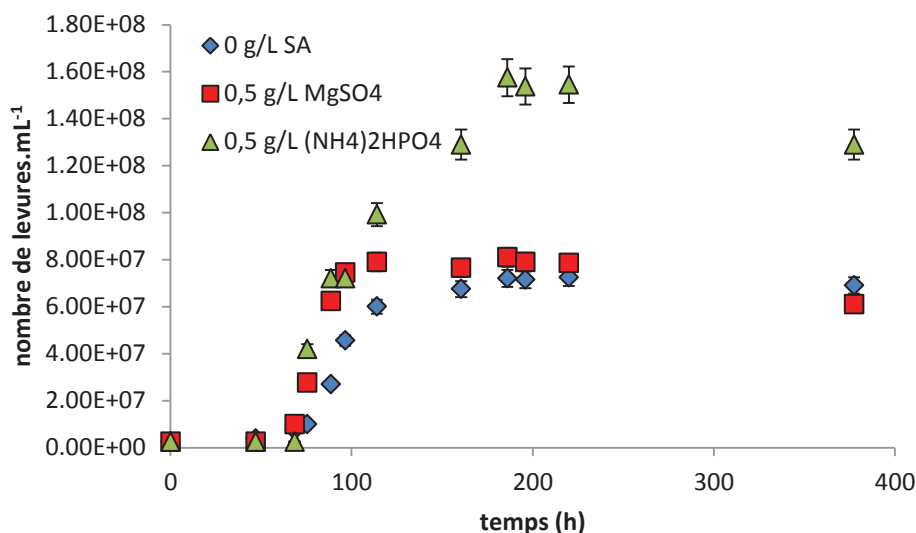


Figure 32. Profils de croissance de l'isolat F1 sans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (\diamond) (témoin), avec MgSO_4 (\square) et avec $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Δ).

La Figure 28 montre trois phases distinctes pour chaque essai. Les fermentations réalisées en absence de SA ne peuvent pas atteindre des niveaux de population au-delà de $8.10^7 \text{ cell.mL}^{-1}$ alors qu'en présence de SA (Figure 25), cette population a pu atteindre $1,75.10^8 \text{ cell.mL}^{-1}$. Au contraire, la population qui a poussé en présence du $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a atteint un niveau maximal de $1,6.10^8 \text{ cell.mL}^{-1}$, valeur proche de celle obtenue dans les conditions avec SA.

Une première conclusion peut être retenue : l'ion ammonium est un facteur qui favorise la croissance de *Brettanomyces* dans le milieu.

V.1.1.1. Incidence de disparition de l'acide *p*-coumarique

Comme dans les fermentations du Chapitre IV, l'acide *p*-coumarique est ajouté en début de la phase stationnaire à une concentration de 10 mg.L^{-1} ($0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$). Concernant la disparition de l'acide *p*-coumarique, une même allure est observée dans la Figure 33 pour 0 g.L^{-1} de SA et en présence de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 , en d'autres termes, lorsque l'ion ammonium est absent du milieu de fermentation. Cette allure montre aussi que l'ion Mg^{2+} n'a pas d'effet. La chute d'acide devient plus rapide lorsque le $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ joue le rôle d'une source d'ammonium. Dans ce dernier cas, la quantité de l'acide ajoutée au début n'est pas la même, une quantité de $0,008 \text{ mmol.L}^{-1}$ disparaît au moment de l'ajout. Ensuite, cette quantité se stabilise entre 50 et 150 h avant de remonter progressivement de $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$ à $0,034 \text{ mmol.L}^{-1}$. Ce phénomène pourrait être causé par un relargage d'acide.

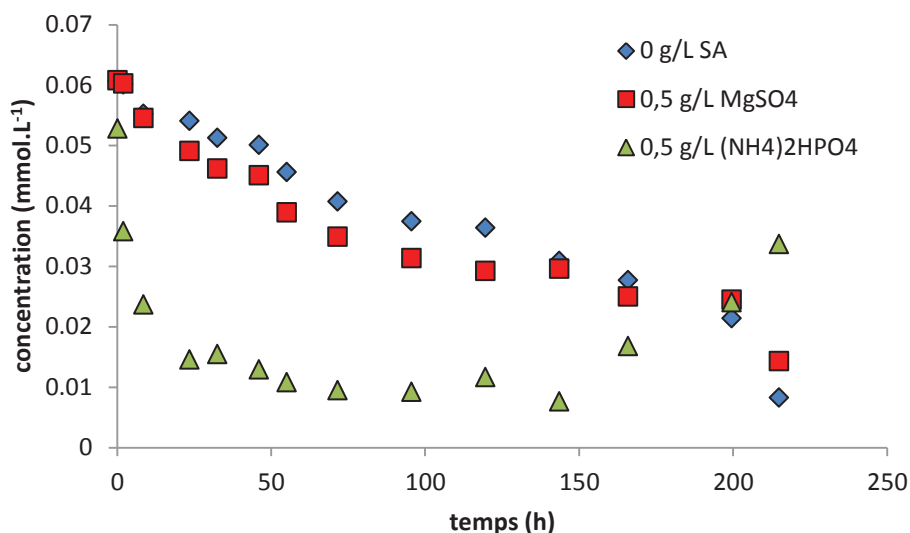


Figure 33. Profils de disparition de l'acide *p*-coumarique chez l'isolat F1 sans (NH₄)₂SO₄ (◇), avec MgSO₄ (□) et avec (NH₄)₂HPO₄ (△).

V.1.1.2. Profil comparatif de bioconversion et de bilan matière

La Figure 34 (A) et (B) montre un profil de bioconversion identique pour 0 g.L⁻¹ de SA et en présence de 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄. La concentration de l'acide diminue rapidement du milieu entre 0-100 h puis se stabilise entre 100 et 200 h avant de rediminuer encore à la fin. Cette chute s'accompagne d'une production importante de 4-vinylphénol qui se stabilise au bout de 120 h mais une faible quantité de 4-éthylphénol apparait. Cette quantité, qui est de moins de 0,01 mmol.L⁻¹ pour les deux cas, apparait en début de réaction et reste stable malgré la disparition de l'acide du milieu. Ce résultat peut s'expliquer par les deux mêmes hypothèses qu'évoquées précédemment : soit que l'acide est rapidement adsorbé sur les parois des levures, soit qu'il est consommé par les levures qui ne peuvent pas le transformer lorsque l'ion ammonium manque dans le milieu. La première ne peut être vraie ou plus exactement on peut dire qu'une partie de l'acide pourrait être adsorbé alors qu'une autre partie est utilisée par la levure puisque du 4-vinylphénol apparait dans le milieu. L'enzyme HcD (responsable de la production des 4-vinylphénols) n'est pas affectée lorsque l'ion ammonium est absent, elle produit une quantité de 4-vinylphénol qui reste stable à partir de 100 h. Au contraire, la vinylphénol réductase parait inactive en raison de la faible quantité de 4-éthylphénol qui apparait dans le milieu.

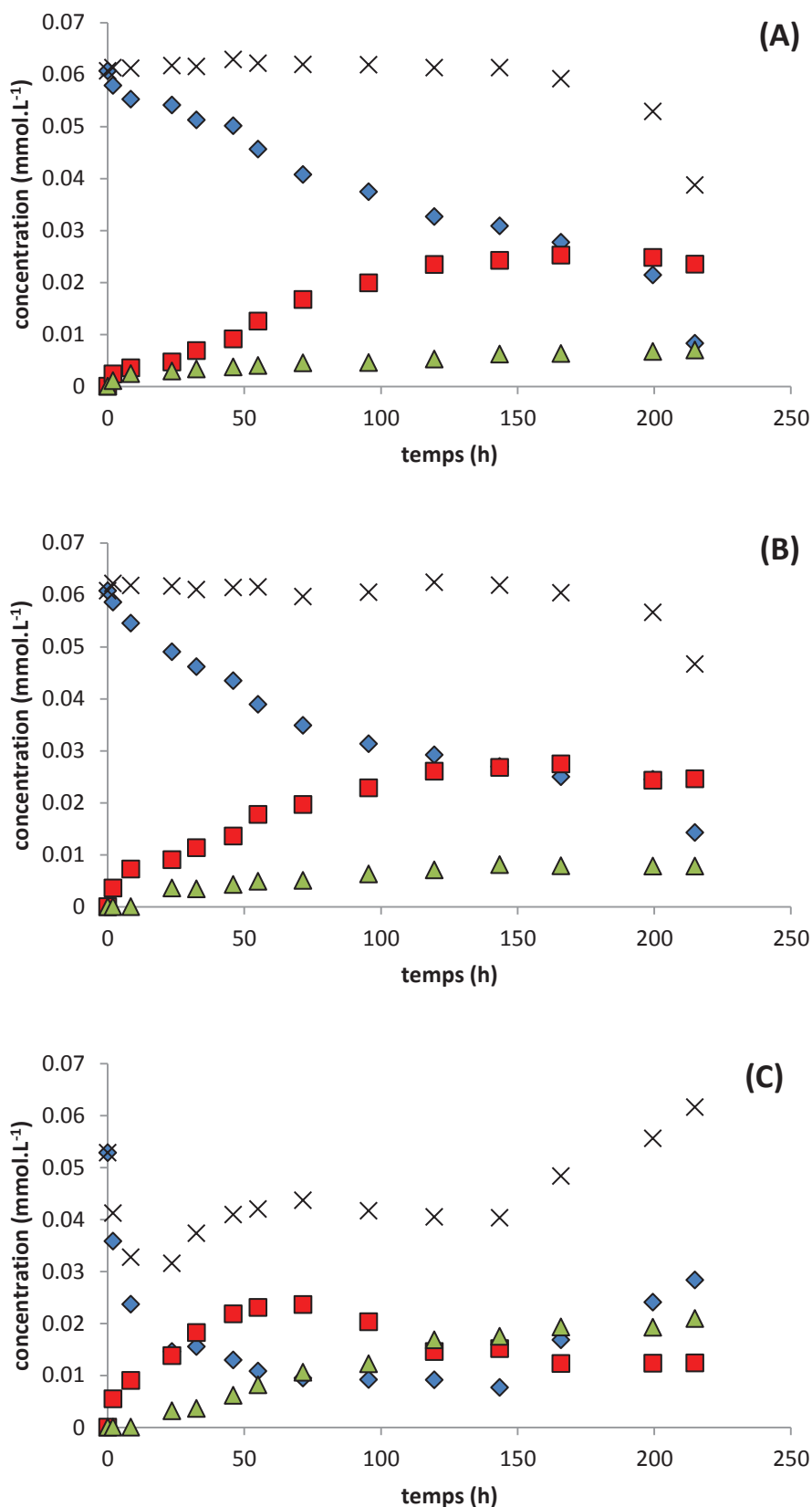


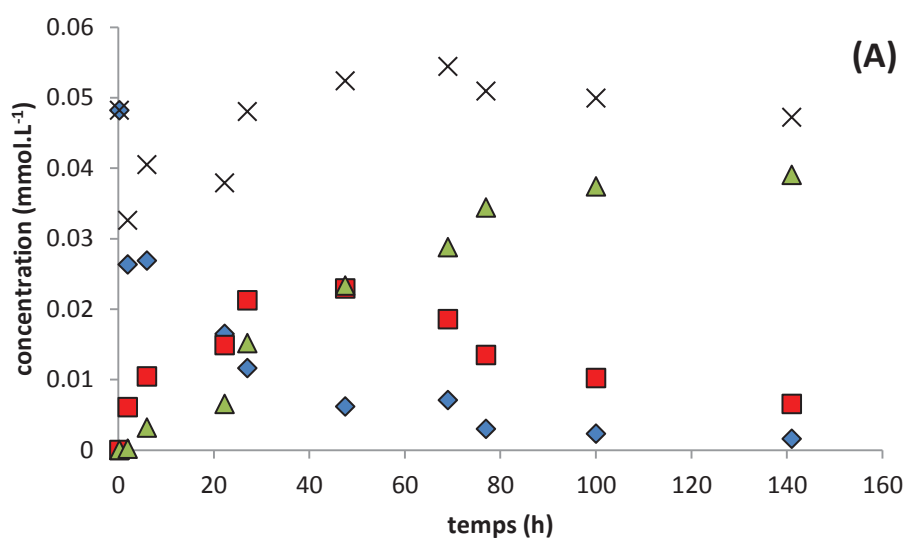
Figure 34. Profil cinétique de biconversion de l'acide *p*-coumarique (A) en absence du (NH₄)₂SO₄, (B) en présence de 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄ et (C) en présence de 0,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄. (◇) acide *p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (△) 4-éthylphénol et (x) bilan matière.

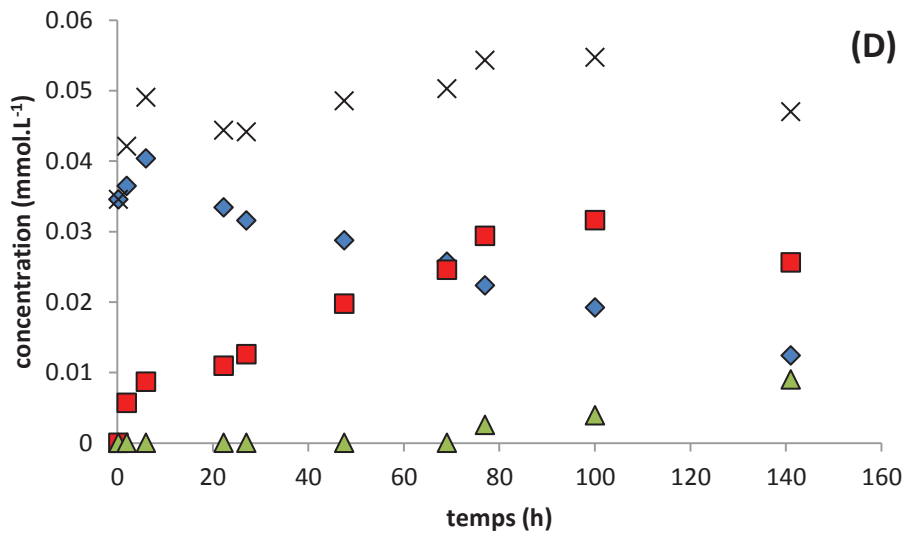
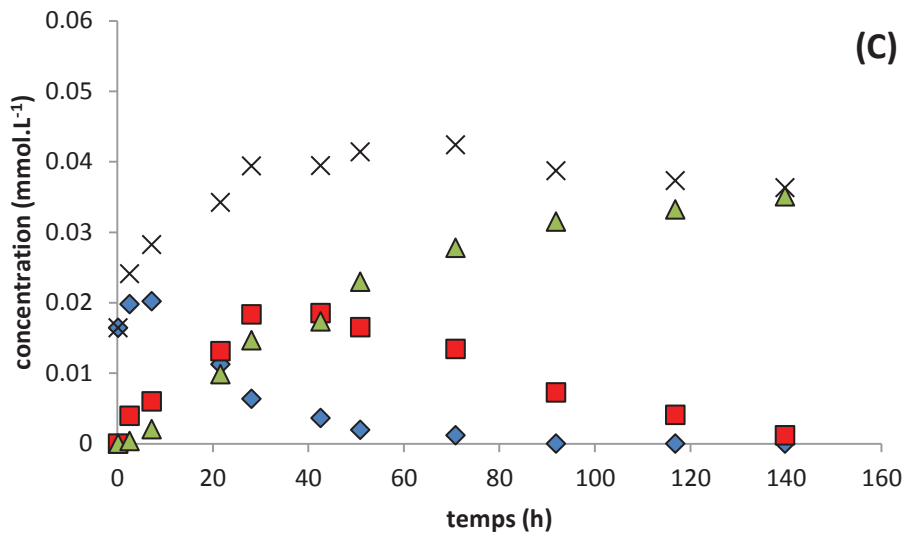
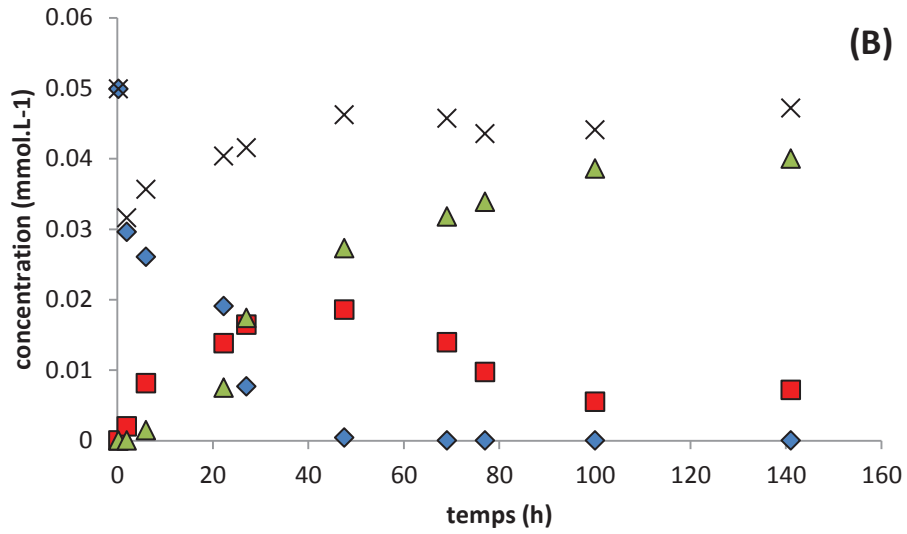
Dans le cas où l'ion NH_4^+ provient de la source $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, la bioconversion démarre. Dans la **Figure 34 (C)**, 2 points importants sont à signaler : d'abord le 4-éthylphénol est produit mais la quantité finale ($0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$) vaut la moitié de celle obtenue dans les conditions normales (voir résultat p.105). L'ion hydrogénophosphate HPO_4^{2-} pourrait être la cause d'un ralentissement ou d'une faible inhibition de la bioconversion. Ensuite, l'acide réapparaît progressivement à partir de 150 h. Il est probablement relargué ou désorbé (ou même sorti du milieu intracellulaire) après son adsorption sur les parois des *Brettanomyces* (ou son entrée). Ce relargage est accompagné d'une augmentation du bilan matière qui arrive à la valeur initiale d'acide ajoutée au début de l'expérimentation.

V.1.2. Etude de l'effet du changement de la concentration du sulfate d'ammonium sur la bioconversion dans le milieu MSV

Outre l'absence de SA, nous avons réalisé 6 autres fermentations avec 6 concentrations différentes de SA : 0,25-1-2-3-6-10 g.L^{-1} . La concentration initiale de 10 g.L^{-1} s'est montrée comme totalement inhibitrice de la croissance de *Brettanomyces*. Les 5 autres expériences de bioconversion sont montrées dans la **Figure 35**.

(◇) acide *p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (△) 4-éthylphénol et (x) bilan matière





(◇) acide *p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol et (x) bilan matière

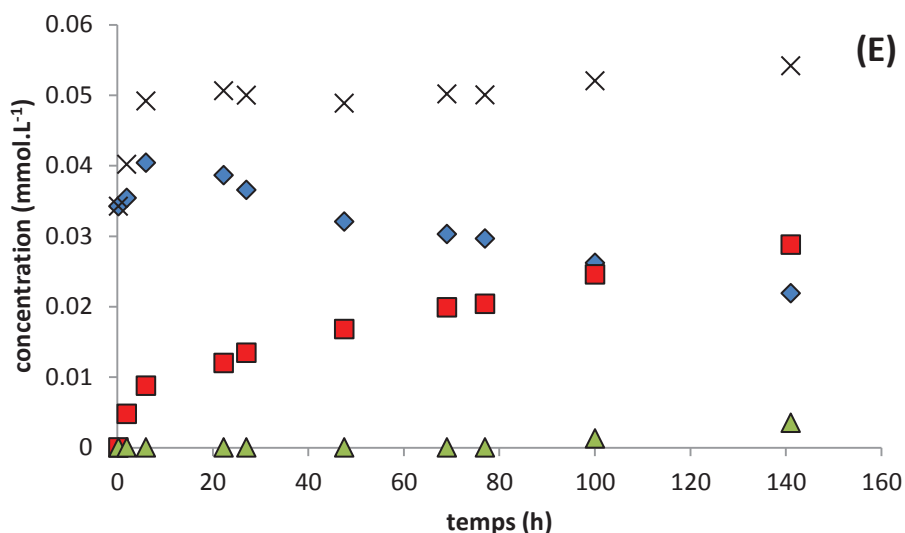


Figure 35. Profil cinétique de biconversion de l'acide *p*-coumarique (A) en présence de $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (B) 1 g.L^{-1} , (C) 2 g.L^{-1} , (D) 3 g.L^{-1} , (E) 6 g.L^{-1} . (◇) acide *p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol et (x) bilan matière.

V.1.2.1. Discussion des courbes et du bilan matière

Les courbes A, B et C de la **Figure 35** présentent des allures identiques : un profil de bioconversion successive [substrat \rightarrow intermédiaire \rightarrow produit]. De même et pour les 3 courbes, nous observons la chute initiale du bilan matière et la disparition de la quantité théorique d'acide ajoutée en début de réaction. Tout au long de la fermentation, on ne retrouve pas cette concentration ($0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$). Le bilan est stable entre $0,04$ et $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$. Le profil cinétique du bilan matière est approximativement le même pour les 5 courbes. La différence entre A et B est la disparition totale de l'acide *p*-coumarique qui se fait vers 40 h pour A et presque au bout de 100 h pour B. Concernant la courbe C, on n'observe que $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ d'acide au début de la réaction et une quantité finale de 4-éthylphénol légèrement inférieure à celles obtenues pour A et B. Au contraire, les concentrations de 3 et 6 g.L^{-1} de SA ralentissent la consommation de l'acide *p*-coumarique et inhibent la production de 4-éthylphénol. Au bout de 140 h, on a toujours $0,01$ et $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$ d'acide pour D et E respectivement. La faible production de 4-éthylphénol ne commence qu'au bout de 70 h pour D et 140 h pour E.

V.1.2.2. Tableau récapitulatif des principales valeurs

Tableau 23. Paramètres cinétiques de la bioconversion de l'acide *p*-coumarique par F1 pour différentes concentrations en sulfate ammonium.

souche F1	concentration de SA (mg.L ⁻¹)							
	0	0,25	0,5	1	2	3	6	10
biomasse maximale (lev.mL ⁻¹) (10 ⁸)	0,8	1,64	1,75	1,79	1,67	1,62	1,51	///
quantité d'acide <i>p</i> -coumarique détectée initialement (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	60	48	53	50	16	34	34	///
quantité finale d'acide <i>p</i> -coumarique (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	6,9	1,6	0	0	0	12	22	///
quantité finale de 4-VP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	2,3	6,5	10	7,1	1,2	2,5	2,8	///
quantité finale de 4-EP (mmol.L ⁻¹) (10 ⁻³)	6,9	39	37	40	35	8,9	3,4	///
quantité finale de bilan matière (10 ⁻³)	39	47	47	47	36	47	54	///
Pourcentage d'acide disparu initialement (%)	0	20	20	17	73	43	43	///
Taux de conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique (%)	89	97	100	100	100	80	64	///
Rendement global en produit (%)	13	67	56	67	59	19	9	///
Disparition de matière (%)	34	21	29	22	40	22	10	///
Rendement en produit (%)	17	83	79	85	97	19	6	///

Le **Tableau 23** montre tout d'abord que les concentrations en sulfate d'ammonium inférieures à 10 g.L⁻¹ n'influencent pas la biomasse à l'exception de son absence totale.

Ensuite, l'absence du SA inhibe la disparition rapide de l'acide en début de réaction, phénomène observé dans la majeure partie des expérimentations. Pour les concentrations de 0,5-1 et 2, l'acide disparaît complètement mais le bilan matière n'est jamais vérifié. Les meilleurs taux de conversion de l'acide et les meilleurs rendements en 4-éthylphénols sont pour les concentrations allant de 0,25 à 2 avec R=97 % pour la concentration de 2 g.L⁻¹. Or les travaux d'Aguilar-Uscanga *et al.* (2000) ont montré que l'ajout de 2 g.L⁻¹ de SA au milieu fermentaire entraînait un effet inhibiteur chez les souches de *B. bruxellensis*. Les faibles rendements (17 %) restent pour 0 g.L⁻¹ de SA et au-delà de 2 g.L⁻¹ (19 et 6 % pour 3 et 6 g.L⁻¹ de SA, respectivement).

V.1.3. Conclusions de la partie 1

- **En absence de sulfate d'ammonium du milieu de fermentation, la disparition de l'acide *p*-coumarique est ralentie et la production de 4-éthylphénol devient très faible (rendement de 17 %).**

- Le sulfate d'ammonium ou plutôt les ions ammonium sont nécessaires pour un bon développement de la population de *Brettanomyces* dans le milieu de fermentation.
- A partir de 3 g.L⁻¹ de sulfate d'ammonium, la production de 4-éthylphénol est ralentie.
- Une concentration de 10 g.L⁻¹ de sulfate d'ammonium inhibe le démarrage de la fermentation et par conséquent la production de 4-éthylphénol.

V.2. Influence du pH et des cellules non proliférantes de *Brettanomyces bruxellensis* sur la production de 4-éthylphénol

V.2.1. Réalisation des expériences

Au total 16 expériences pour chacune des 2 souches choisies ont été réalisées :

Quatre dilutions de populations: 10⁵-10⁶-10⁷-10⁸ levures.mL⁻¹ dans quatre milieux tamponnés à pH 2,6 - 3 - 3,4 - 4 (Tableau 24).

Dans tous les milieux tampons, les inocula proviennent de fermentations réalisées dans des conditions normales avec des levures récoltées en début de phase stationnaire. Ces levures non proliférantes sont observées pendant 200 h dans le milieu tampon contenant le substrat.

Tableau 24. Valeurs et facteurs étudiés.

Facteur	Valeurs															
souches	F1 / L2															
pH	2,6				3				3,4				4			
biomasse (lev.mL ⁻¹)	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸

V.2.2. Récapitulatif des résultats des courbes

Tableau 25. Récapitulatif des valeurs relatives aux courbes présentées dans l'ANNEXE I pour la souche F1.

Les concentrations sont en (mmol.L ⁻¹)													
		Biomasse (lev.mL ⁻¹)	acide dosé	AD (%)	acide final	T (%)	4-VP final	4-EP final	RG (%)	BM final	D (%)	R (%)	Remarques
F1	2,6	1.10 ⁵	0,0578	4	0,0375	38	0	0	0	0,0375	38	0	BM comme l'acide
		1.10 ⁶	0,0514	14	0,0288	52	0	0	0	0,0288	52	0	BM comme l'acide
		1.10 ⁷	0,0361	40	0,0327	46	0,0063	0	0	0,0391	35	0	
		1.10 ⁸	0,0478	20	0,022 → 0,034	43	0,0033	0,0268	103	0,06	0	45	désorption de l'acide
	3	1.10 ⁵	0,0568	5	0,0352	41	0,0074	0	0	0,0426	29	0	
		1.10 ⁶	0,0545	9	0,0321	47	0,0412	0	0	0,0412	31	0	
		1.10 ⁷	0,057	5	0,01 → 0,024	60	0,02	0,0156	43	0,06	0	26	désorption de l'acide
		1.10 ⁸	0,0437	27	0 → 0,006	90	0,0158	0,04	74	0,06	0	67	peu de désorption
	3,4	1.10 ⁵	0,06	0	0,029	52	0,008	0	0	0,037	38	0	
		1.10 ⁶	0,056	7	0,029	52	0	0	0	0,039	35	0	
		1.10 ⁷	0,044	27	0	100	0,036	0,015	25	0,053	12	28	
		1.10 ⁸	0,017	72	0,002 → 0,01	83	0,008	0,0314	63	0,049	18	64	peu de désorption
	4	1.10 ⁵	0,057	5	0,046	23	0,009	0,006	43	0,06	0	10	
		1.10 ⁶	0,06	0	0,005	92	0,003	0,019	35	0,027	55	70	
		1.10 ⁷	0,035	42	0,005	92	0,0117	0,032	58	0,048	20	67	
		1.10 ⁸	0,022	64	0	100	0,01	0,041	68	0,052	13	79	

Tableau 26. Récapitulatif des valeurs relatives aux courbes présentées dans l'ANNEXE I pour la souche L2.

		Les concentrations sont en (mmol.L ⁻¹)													
	pH	Biomasse (lev.mL ⁻¹)	acide dosé	AD (%)	acide final	T (%)	4-VP final	4-EP final	RG (%)	BM final	D (%)	R (%)	Remarques		
	L2	1.10 ⁵	0,0603	0	0,0015	98	0	0	0	0,0015	98	0	adsorption-désorption au début		
		1.10 ⁶	0,0551	8	0,0077	87	0	0	0	0,0077	87	0	adsorption-désorption au début		
		1.10 ⁷	0,0548	9	0,0192	68	0,0117	0	0	0,031	48	0	adsorption-désorption au début		
		1.10 ⁸	0,0536	11	0,00006→0,035	42	0	0	0	0,0357	41	0	désorption de l'acide		
		1.10 ⁵	0,049	18	0,037→0,06	0	0	0	0	0,06	0	0	désorption de l'acide		
	3	1.10 ⁶	0,055	8	0,044→0,06→0,044	27	0	0	0	0,044	27	0	désorption de l'acide		
		1.10 ⁷	0,045	25	0,015	75	0,01	0,01	22	0,04	33	25			
		1.10 ⁸	0,044	27	0	100	0,016	0,044	73	0,06	0	73			
		1.10 ⁵	0,053	12	0,032	47	0	0	0	0,032	47	0			
	3,4	1.10 ⁶	0,046	23	0,003	95	0	0	0	0,003	95	0			
		1.10 ⁷	0,032	47	0,001→0,014	77	0,015	0,02	43	0,05	17	40	peu de désorption		
		1.10 ⁸	0,014	77	0	100	0,01	0,045	75	0,055	8	82			
		1.10 ⁵	0,06	0	0,032	47	0	0	0	0,032	47	0			
	4	1.10 ⁶	0,053	12	0,017→0,022	63	0,008	0	0	0,031	48	0	peu de désorption		
		1.10 ⁷	0,041	32	0	100	0,026	0,033	55	0,06	0	55			
		1.10 ⁸	0,022	63	0→0,012	80	0,008	0,047	98	0,06	0	78	peu de désorption		

V.2.3. Relations

Pour tous les essais, nous avons commencé par tracer la relation entre la quantité d'acide *p*-coumarique dosée juste après ajout et la biomasse présente initialement dans le milieu.

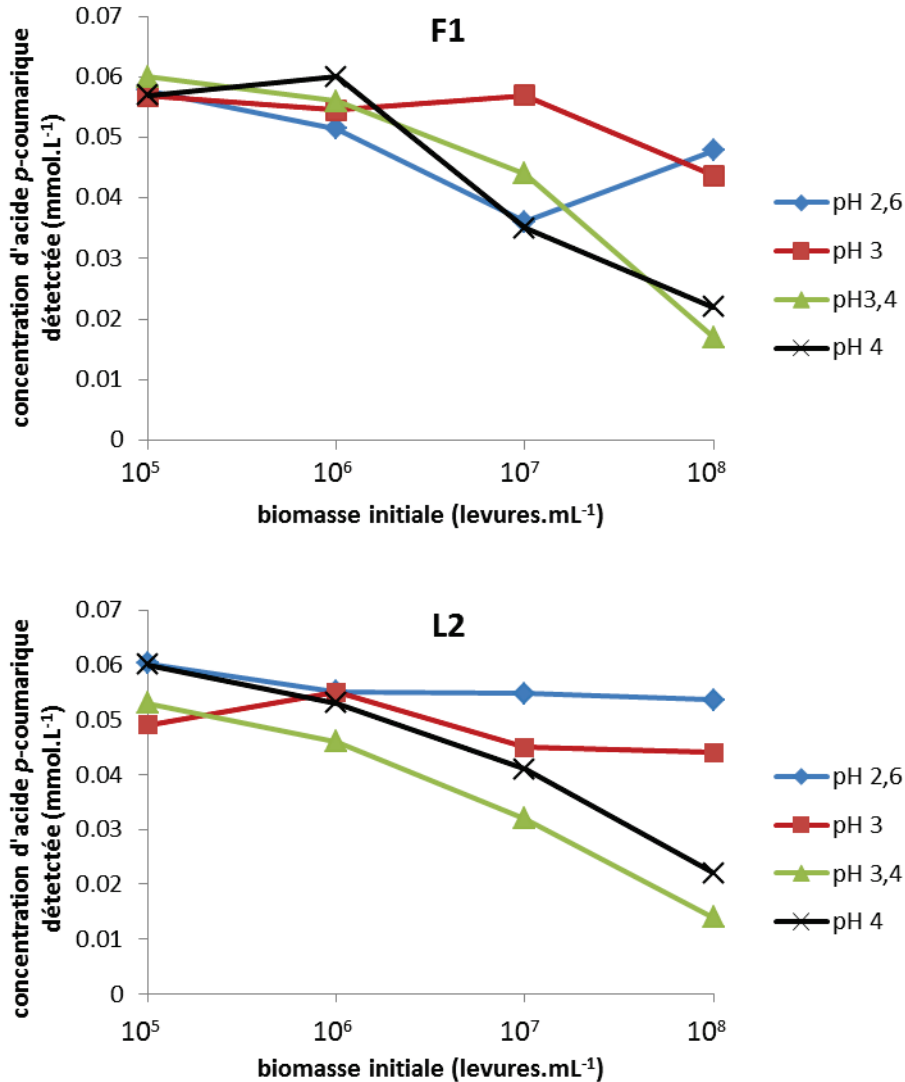


Figure 36. Relation entre la quantité d'acide *p*-coumarique détectée initialement (après ajout) et la biomasse présente initialement dans le milieu.

La **Figure 36** montre que pour les 2 souches, la quantité d'acide qui disparaît dépend de la concentration de la biomasse. Pour les 2 valeurs de pH (3,4 et 4), cette disparition est plus claire alors que pour 2,6 et 3, elle semble plus faible ou ralentie. Nous pouvons suggérer que c'est un phénomène d'adsorption instantanée qui se produit au même moment de l'ajout et que les pH 3,4 et 4 influencent positivement les capacités d'adsorption.

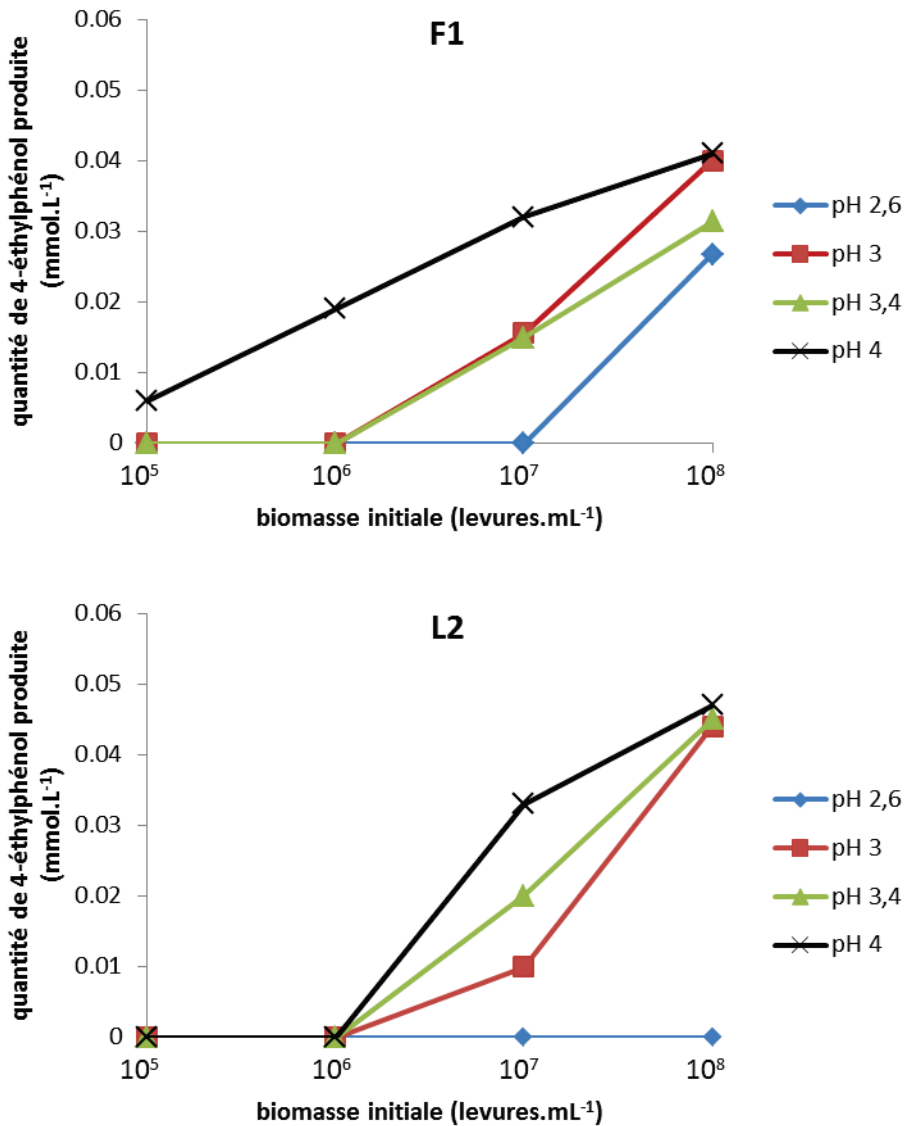


Figure 37. Relation entre biomasse initiale non proliférante et quantité de 4-éthylphénol produite.

La **Figure 37** montre que la quantité finale de 4-éthylphénol est plus importante d'autant plus que la concentration de levures est élevée dans le milieu.

Nous avons aussi remarqué que le pH a un effet variable sur les souches. Pour F1, plus le pH s'élève, plus la quantité de produit devient importante. A pH 2,6, la souche L2 était incapable de produire des éthylphénols même à la concentration cellulaire la plus élevée. Alors que pour les 3 autres valeurs, le rendement final est presque le même. Donc seule la valeur de 2,6 s'est montrée inhibitrice sans trop de différence pour les autres. Globalement, la production des éthylphénols pour L2 nécessite une biomasse plus importante. Aux pH plus élevés et pour une

même biomasse initiale, la production paraît plus forte. Ceci montre aussi l'activité spécifique différente chez chaque souche.

V.2.4. Conclusions de la partie 2

- Pour les pH 2,6 - 3 et 3,4, pas de production de 4-éthylphénol pour les populations de 10^5 et 10^6 lev.mL⁻¹ pourtant l'acide disparaît du milieu entraînant une diminution du bilan matière. Seule à pH 4, la souche F1 est capable de produire ces molécules à partir de 10^5 lev.mL⁻¹. La valeur de pH 4 semble être la condition de pH la plus favorable à la bioconversion de la souche F1.
- A pH 2,6, la souche L2 est incapable de former des 4-éthylphénols même à une population de 10^8 lev.mL⁻¹. Pour F1, la quantité formée est la plus faible à cette valeur de pH.
- Les phénomènes de disparition-réapparition de l'acide *p*-coumarique sont mis en évidence dans plusieurs cas.
- La disparition rapide de l'acide *p*-coumarique est dépendante du niveau de population : plus le nombre de levures est élevé dans le milieu, plus la disparition est observée. En effet, le bilan matière n'est jamais vérifié en début de réaction pour les populations de 10^7 et 10^8 lev.mL⁻¹.

V.3. Travail préliminaire pour la mise au point d'un kit de détection des *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin

V.3.1. Introduction

En tenant compte des hypothèses retenues de la partie 2 (lien entre niveau de population et production de 4-éthylphénol), nous allons essayer de vérifier la capacité de production des 4-éthylphénols sur plusieurs souches en partant d'une concentration initiale de population différente.

Le but de cette étude est de fournir aux viticulteurs un moyen simple, rapide, efficace et peu coûteux permettant de mettre en évidence une éventuelle production de 4-éthylphénols dans leur vin par *B. bruxellensis*.

(i) Simple: il doit être aisément mis en œuvre, même dans les caves peu équipées en matériel d'analyse.

(ii) Rapide: à l'heure actuelle, le vigneron doit envoyer son échantillon à un gros laboratoire d'œnologie puis attendre les résultats. Cette attente peut varier de 5 à 15 jours selon la méthode utilisée. Or, s'il y a contamination, il faut savoir réagir très vite avant qu'elle ne s'aggrave.

(iii) Efficace: le test doit être spécifique des *B. bruxellensis* vivantes, quantitatif et qualitatif.

(iv) Peu coûteux: à l'heure actuelle et selon la méthode utilisée, les viticulteurs doivent déboursier entre 30 et 80 € par analyse.

V.3.2. Problématique et objectif de l'application

Le **Sniff Brett® de TECH'SERVE**, produit existant déjà sur le marché, permet actuellement la détection olfactive des *B. bruxellensis* dans le vin. Le principe est simple : le viticulteur rajoute 20 mL de vin aux 20 mL de milieu Sniff Brett® qui lui sont fournis puis il incube la solution obtenue à 28°C (s'il possède une étuve) ou à température ambiante jusqu'à l'apparition d'une odeur désagréable. Le kit Sniff Brett® inclut une table de correspondance entre le nombre de jours nécessaires à l'apparition de l'odeur et le niveau de contamination (en nombres de cellules par mL).

Ce produit pourrait sembler parfait. Néanmoins, il présente quelques inconvénients :

- A moins que la contamination soit telle qu'on puisse déjà la sentir directement dans le vin, l'obtention d'une odeur peut mettre jusqu'à dix jours ce qui est très long.
- Il semblerait que d'autres levures puissent pousser dans le milieu Sniff Brett, faussant les résultats puisqu'il s'installe une compétition pour les nutriments pouvant modifier la croissance de *B. bruxellensis*.
- La détection olfactive peut être parfois suggestive, le niveau de sensibilité variant suivant les personnes en fonction notamment de leur entraînement.
- La table de correspondance entre nombre de jours d'apparition de l'odeur et niveau de contamination ne paraît pas scientifiquement réaliste dans la mesure où il a été montré de nombreuses fois dans la bibliographie que la cinétique de production des 4-éthylphénols est très variable suivant les souches.

De son côté, la société **BIOSANTEC** a pour but de mettre sur le marché un nouveau test, se basant sur le principe du Sniff Brett mais en essayant de gommer ses désavantages. Le premier but a été d'améliorer le milieu d'enrichissement des *B. bruxellensis* pour le rendre plus spécifique et surtout plus rapide pour la production de 4-éthylphénols. Avec leur nouveau

milieu, sur les tests effectués, la détection olfactive des 4-éthylphénols apparaît plus rapidement qu'avec le Sniff Brett. L'objectif est alors d'essayer de trouver un moyen de détecter plus rigoureusement que par l'odeur la quantité de 4-éthylphénols produite par les *Brettanomyces*. L'utilisation de l'enzyme 4-EPMH semble prometteuse sur ce point. Sa limite de détection des 4-éthylphénols se situe autour de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (à confirmer).

La tâche du Laboratoire de Génie Chimique consistait à tester le protocole d'enrichissement avec différentes souches de *Brettanomyces*, suivre en cinétique la population et l'apparition des 4-éthylphénols par HPLC afin d'établir le temps minimum d'incubation dans le milieu d'enrichissement nécessaire pour la détection des 4-éthylphénols par le traitement à l'enzyme 4-EPMH. Accessoirement, ces essais permettront également de confirmer (ou non) que les tables de correspondances nombre de jours d'apparition de l'odeur et niveau de contamination sont souches-dépendantes.

V.3.3. Premiers résultats obtenus

V.3.3.1. Evolution de la population en fonction du temps

La **Figure 38** montre le développement de levures qui a eu lieu tout au long des 6 jours dans le milieu enrichi MYPG. Même partant de 1 levure au départ (ou plus exactement <5 avec toutes les erreurs de dilution), on arrive facilement à repérer un culot formé au fond de l'erlenmeyer. Le **Tableau 27** exprime le nombre de levures obtenu en fonction du temps, les comptages étant réalisés au microscope optique et sur cellule de Thoma.

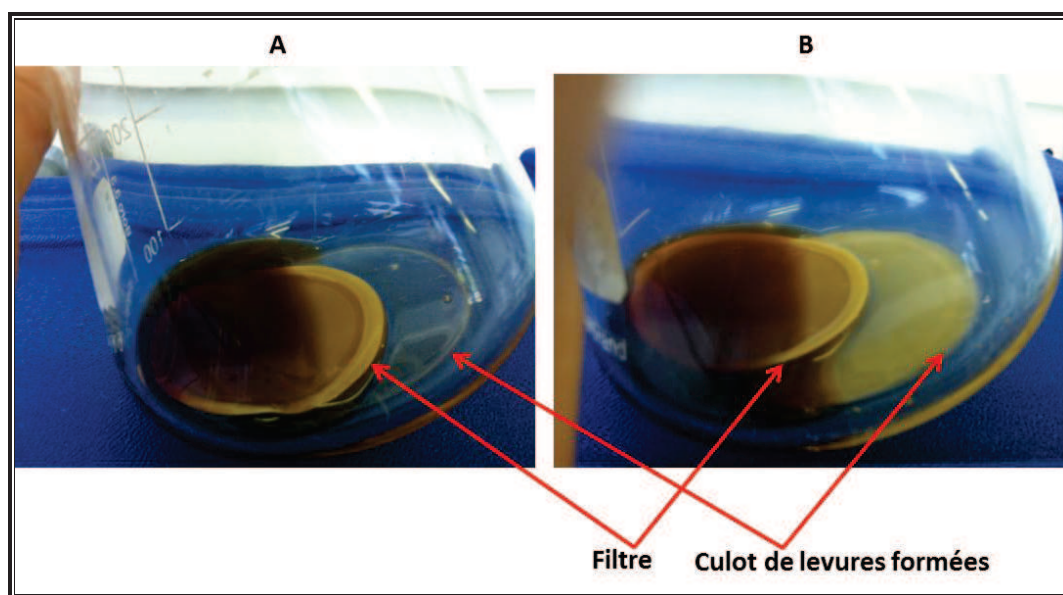


Figure 38. Résultats obtenus après 7 jours, (A) partant de 1 levure au départ, (B) partant de 100000 levures.

Tableau 27. Nombre de levures obtenu après 6 jours d'incubation du filtre dans 20 mL de milieu MYPG (concentrations en cellules.mL⁻¹ de milieu).

L1	nombre initial de levure/20mL	jour 0	jour 1	jour 2	jour 3	jour 4	jour 5	jour 6
	1	NC	NC	NC	NC	NC	4.10 ⁶	9,4.10 ⁷
	10	NC	NC	NC	NC	4,69.10 ⁴	5,5.10 ⁶	9,5.10 ⁷
	100	NC	NC	NC	NC	2,3.10 ⁶	3,45.10 ⁷	2,2.10 ⁸
	1000	NC	NC	NC	6,00.10 ⁵	4,25.10 ⁶	1,17.10 ⁸	2,88.10 ⁸
	10000	NC	NC	NC	3,25.10 ⁶	5.10 ⁷	2,5.10 ⁸	4,2.10 ⁸
	100000	NC	NC	NC	8,75.10 ⁶	6,25.10 ⁷	5,3.10 ⁸	6,04.10 ⁸

F1	nombre initial de levure/20mL	jour 0	jour 1	jour 2	jour 3	jour 4	jour 5	jour 6
	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	10	NC	NC	NC	NC	1.10 ⁵	5,1.10 ⁶	2,52.10 ⁷
	100	NC	NC	NC	NC	1,7.10 ⁶	5,33.10 ⁷	1,03.10 ⁸
	1000	NC	NC	NC	7,5.10 ⁵	3,3.10 ⁶	1,86.10 ⁸	3,93.10 ⁸
	10000	NC	NC	NC	3.10 ⁶	3,95.10 ⁷	2,43.10 ⁸	6,8.10 ⁸
	100000	NC	NC	NC	6,4.10 ⁶	6,6.10 ⁷	4,1.10 ⁸	7,8.10 ⁸

F2	nombre initial de levure/20mL	jour 0	jour 1	jour 2	jour 3	jour 4	jour 5	jour 6
	1	NC	NC	NC	NC	NC	1.10 ⁵	8.10 ⁵
	10	NC	NC	NC	NC	1,5.10 ⁵	5,6.10 ⁶	5,3.10 ⁷
	100	NC	NC	NC	NC	1,65.10 ⁶	5,35.10 ⁷	1,13.10 ⁸
	1000	NC	NC	NC	8.10 ⁵	4,4.10 ⁶	2,34.10 ⁸	2,85.10 ⁸
	10000	NC	NC	NC	3,6.10 ⁶	6,39.10 ⁷	2,97.10 ⁸	6,08.10 ⁸
	100000	NC	NC	NC	6,7.10 ⁶	1,13.10 ⁸	4,2.10 ⁸	6,52.10 ⁸

L3	nombre initial de levure/20mL	jour 0	jour 1	jour 2	jour 3	jour 4	jour 5	jour 6
	1	NC	NC	NC	NC	NC	4,69.10 ⁴	9,38.10 ⁴
	10	NC	NC	NC	NC	NC	1,9.10 ⁶	4,6.10 ⁷
	100	NC	NC	NC	NC	4.10 ⁵	7,1.10 ⁶	1,78.10 ⁸
	1000	NC	NC	NC	2,5.10 ⁵	6.10 ⁵	3,95E+07	5,2.10 ⁸
	10000	NC	NC	NC	1,25.10 ⁶	1,6.10 ⁶	1,18.10 ⁸	5,88.10 ⁸
	100000	NC	NC	NC	1,55.10 ⁶	1,7.10 ⁶	2,43.10 ⁸	7,6.10 ⁸

*NC : non comptable sur cellule de Thoma.

Pour les 4 levures testées, le milieu a permis la croissance des souches. Logiquement plus le taux de contamination initial est élevé et plus la méthode de comptage permet de les détecter tôt. 3 jours minimum sont cependant nécessaires pour atteindre des niveaux détectables avec

la méthode de comptage au microscope pour des contaminations comprises entre 1000 et 100000 cellules pour 20 mL soit des concentrations de 50 à 5000 cellules.mL⁻¹. Pour des concentrations comprises entre 0,05 et 5 cellules.mL⁻¹, il faut de 4 à 6 jours pour atteindre le seuil détectable à savoir entre 100 000 et 1 000 000 de cellules.mL⁻¹.

La **Figure 39** montre les différents niveaux de population atteints par chacune des souches après 6 jours d'incubations. Nous constatons que les comportements sont assez proches entre ces 4 souches.

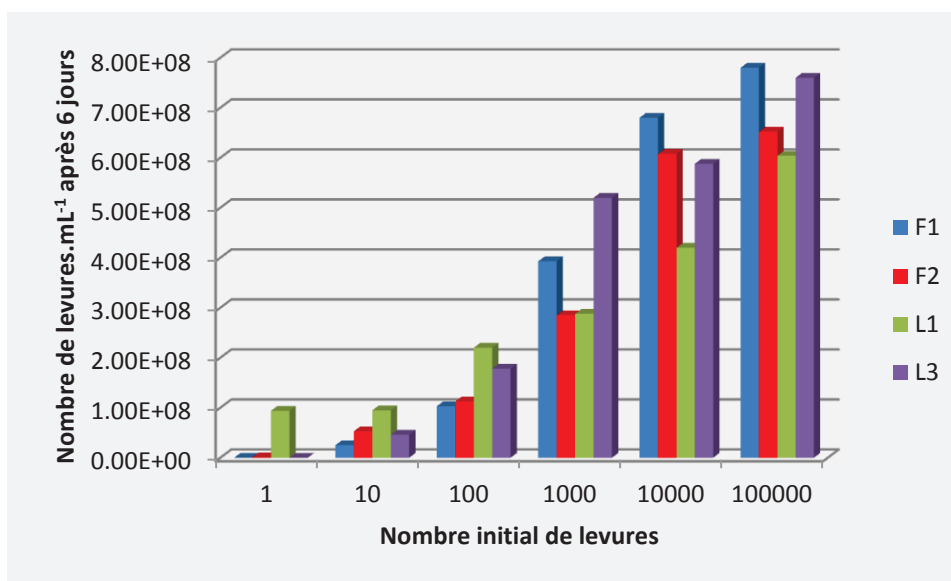


Figure 39. Nombre de cellules après 6 jours d'incubations dans le milieu MYPG pour les 4 souches testées (F1, F2, L1 et L3) suivant le taux de contamination de l'échantillon de vin (de 1 à 100000 cellules dans 20 mL).

V.3.3.2. Dosage des 4-éthylphénols et 4-vinylphénols

Notons que la méthode a été difficile à mettre au point pour le milieu MYPG car il contient une très grande quantité d'extrait de levures qui vient parasiter la forme des pics sortant au chromatogramme. Une défécation au préalable de l'échantillon a permis d'améliorer les pics mais ils restent encore difficiles à intégrer. Une intégration automatique des pics n'est pas possible. Il est nécessaire de retraiter chacun des chromatogrammes pour les intégrer manuellement (et parfois un peu subjectivement) afin d'obtenir des résultats corrects. Le **Tableau 28** présente les concentrations en 4-éthylphénols et 4-vinylphénols. Les dosages n'ont pu être réalisés pour l'instant que pour 3 souches.

Tableau 28. Concentrations en [mg.L⁻¹] des 4-éthylphénols et 4-vinylphénols formés au cours des 6 jours d'incubation dans le milieu MYPG pour F1, F2 et L3 respectivement.

F1 1levure			F1 10levures			F1 100levures		
concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10	0	0.00	10.00
1	0.00	10.00	1	0.00	9.89	1	1.25	9.10
2	0.00	9.98	2	0.00	9.69	2	1.61	8.52
3	0.00	9.65	3	0.00	9.28	3	1.86	8.19
4	0.00	9.00	4	0.89	9.24	4	1.99	8.71
5	0.00	8.65	5	1.70	7.44	5	2.47	6.47
6	0.90	7.99	6	2.06	6.98	6	3.06	6.03

F1 1000levures			F1 10000levures			F1 100000levures		
concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00
1	1.62	9.40	1	1.64	6.35	1	1.91	5.78
2	2.21	8.59	2	2.16	4.24	2	2.07	4.57
3	2.29	6.90	3	2.55	3.91	3	2.96	3.95
4	2.99	6.38	4	2.84	3.50	4	3.70	2.47
5	3.69	5.63	5	4.24	0.65	5	6.56	0.03
6	4.70	4.55	6	6.78	0.38	6	7.61	0.00

F2 1levure			F2 10levures			F2 100levures		
concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10
1	0.00	10.00	1	0.00	9.23	1	0.00	10
2	0.00	10.00	2	0.00	9.05	2	0.00	9.65
3	0.00	10.00	3	0.00	8.99	3	1.99	8.56
4	0.00	9.99	4	0.57	6.78	4	2.7	6.01
5	0.00	9.87	5	1.05	5.65	5	3.15	2.87
6	0.95	7.89	6	2.49	3.94	6	3.64	2.04

F2 1000levures			F2 10000levures			F2 100000levures		
concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00
1	0.00	10.00	1	0.10	7.99	1	0.33	6.71
2	0.00	9.56	2	1.12	5.65	2	1.11	4.59
3	1.93	7.05	3	2.69	3.19	3	2.25	2.37
4	2.13	5.96	4	3.35	2.07	4	3.33	1.00
5	3.41	2.43	5	4.30	0.26	5	4.63	0.00
6	4.37	2.34	6	5.13	0.00	6	6.34	0.00

L3 1levures			concentration [mg.L ⁻¹]			L3 10levures			concentration [mg.L ⁻¹]			L3 100levures			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00
1	0.00	10.00	1	0.00	10.00	1	0.00	10.00	1	0.00	9.75	1	0.00	9.75	1	0.00	9.75
2	0.00	10.00	2	0.00	10.00	2	0.00	9.86	2	0.00	8.85	2	0.00	8.85	2	0.00	8.85
4	0.00	10.00	4	0.00	10.00	4	0.00	9.65	4	0.98	6.01	4	0.98	6.01	4	0.98	6.01
5	0.00	9.85	5	1.14	8.12	5	1.14	8.12	5	1.52	5.54	5	1.52	5.54	5	1.52	5.54
6	0.97	8.32	6	1.78	7.05	6	1.78	7.05	6	2.89	4.04	6	2.89	4.04	6	2.89	4.04

L3 1000levures			concentration [mg.L ⁻¹]			L3 10000levures			concentration [mg.L ⁻¹]			L3 100000levures			concentration [mg.L ⁻¹]		
jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP	jour	4-EP	4-VP
0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00	0	0.00	10.00
1	0.00	9.98	1	1.67	7.46	1	1.67	7.46	1	1.22	5.34	1	1.22	5.34	1	1.22	5.34
2	1.96	6.89	2	2.00	4.43	2	2.00	4.43	2	1.83	6.09	2	1.83	6.09	2	1.83	6.09
4	3.03	5.47	4	2.78	3.40	4	2.78	3.40	4	2.64	3.09	4	2.64	3.09	4	2.64	3.09
5	3.69	4.52	5	3.98	2.40	5	3.98	2.40	5	5.42	0.73	5	5.42	0.73	5	5.42	0.73
6	4.10	3.52	6	5.23	1.09	6	5.23	1.09	6	6.77	0.00	6	6.77	0.00	6	6.77	0.00

Les résultats du **Tableau 28** montrent que :

- Partant de 1 levure au départ, la production de 4-éthylphénol ne commence qu'au bout du 7^{ème} jour pour les 3 isolats testés alors qu'en partant de 10 levures cette quantité se produit entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour. Plus le nombre initial de levures augmente, plus la production de 4-éthylphénol se fait rapidement.
- A partir de 100 000 levures/20 mL, la quantité de 4-vinylphénol disparaît complètement du milieu au bout du 6^{ème} jour pour F1 et L3 et au bout du 5^{ème} jour pour F2.
- Le bilan matière n'est cependant jamais totalement vérifié puisque 10 mg.L⁻¹ de 4-vinylphénol devraient donner 10 mg.L⁻¹ de 4-éthylphénol alors que l'on en retrouve entre 6 et 7 mg.L⁻¹. Ceci peut s'expliquer par 2 hypothèses :
 - Quand la concentration de levures dans le milieu est élevée, un phénomène d'adsorption du 4-vinylphénol sur les parois des *Brettanomyces* peut avoir lieu.
 - Le réactif 4-vinylphénol peut se transformer par d'autres voies différentes de biosynthèse.

En ce qui concerne les cinétiques d'apparition des 4-éthylphénols, elles sont sensiblement identiques entre les 3 souches. Nous pouvons voir sur la **Figure 40** pour 3 niveaux de contamination différents, les quantités de 4-éthylphénols formés pour un même temps sont quasi équivalentes.

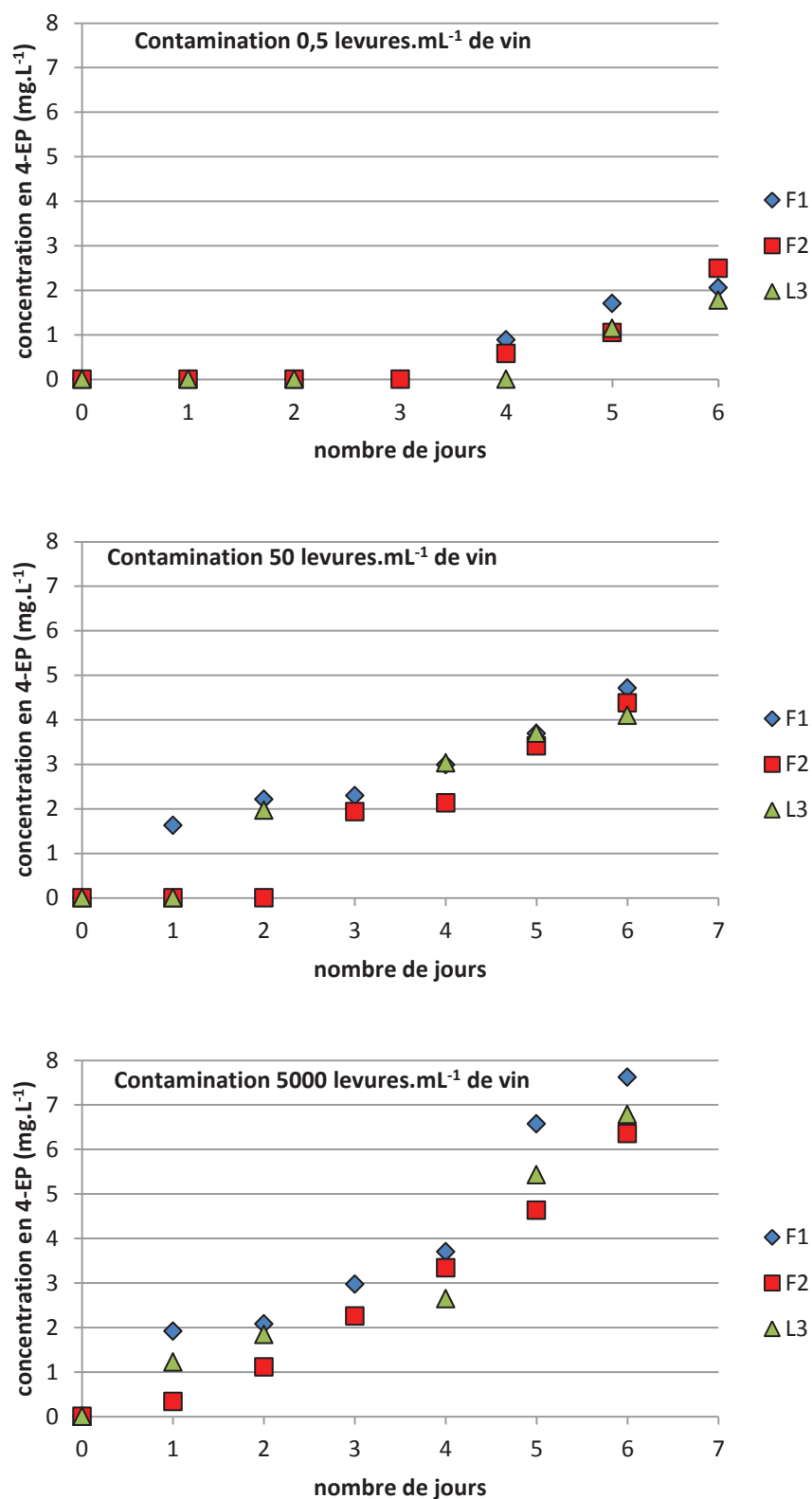


Figure 40. Cinétiques d'apparition des 4-éthylphénols dans le milieu MYPG pour les 3 souches testées pour 3 contaminations initiales (0,5 ; 50 et 5000 cellules.mL⁻¹).

Sur la **Figure 41** est représenté le nombre de jours nécessaires pour qu'il y ait au moins 1 mg.L⁻¹ de 4-éthylphénol dans le milieu suivant le taux de contamination initial. Il apparaît qu'il suffit d'1 jour pour les 3 souches lorsque la contamination est d'au moins 5000 cellules.mL⁻¹, 3 jours au maximum lorsqu'elle est de 50 cellules.mL⁻¹ et 5 jours pour 0,5 cellules.mL⁻¹.

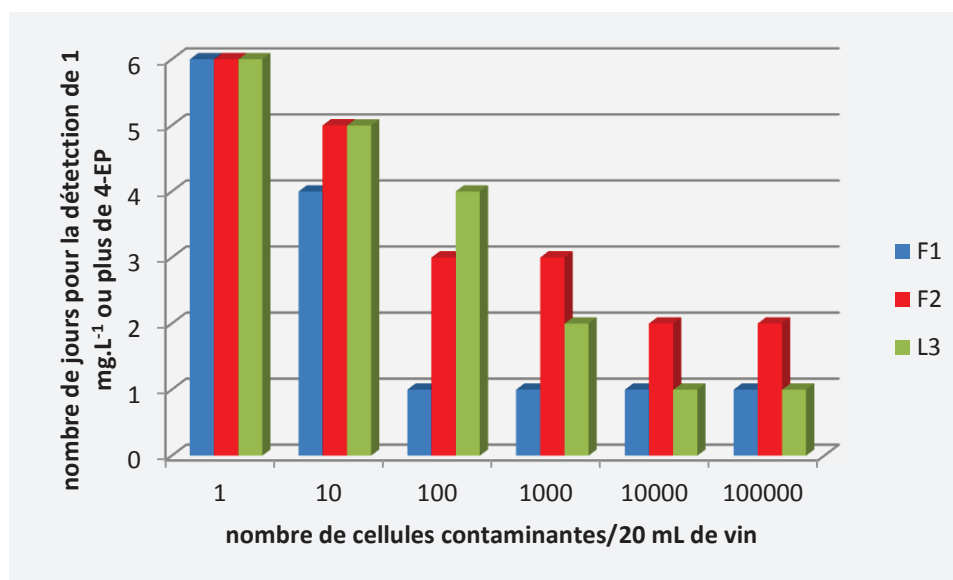


Figure 41. Nombre de jours d'incubation dans le milieu MYPG nécessaire pour doser au minimum 1 mg.L⁻¹ de 4-éthylphénols suivant la contamination initiale.

V.3.4. Conclusion des premiers essais et perspectives pour la suite de l'étude

- **Les durées obtenues sont donc tout à fait intéressants par rapport aux tests actuels. Le fait que les 3 souches testées présentent les mêmes cinétiques de production pour ce milieu MYPG est également encourageant pour relier une quantité de 4-éthylphénols détectée à une contamination initiale du vin.**

Le premier axe de cette étude a porté sur la détection olfactive de *B. bruxellensis* et notamment sur l'optimisation d'une technique existante (Sniff Brett ®) par l'amélioration du milieu de sélection/enrichissement. Les résultats ont montré que le milieu MYPG permettait de détecter une contamination issue d'une seule cellule de *B. bruxellensis* au bout de 6 jours, simplement par olfaction. Ce temps d'incubation est presque 2 fois inférieur à celui obtenu par l'utilisation du Sniff Brett®. Nous avons confirmé les résultats par le dosage des phénols volatils chez plusieurs souches. Néanmoins, bien que cette technique se soit révélée très simple et peu coûteuse, ce test n'est pas quantitatif car l'odorat humain est très subjectif. Ce milieu constituera la première étape du kit.

Dans la deuxième partie de ce travail, les recherches se concentrent sur une enzyme provenant de la bactérie *Pseudomonas putida*. L'enzyme 4-EPMH de *P. putida* (Reeve *et al.*, 1989) convertit le 4-éthylphénol en 4-hydroxyacétophénone, une molécule à l'odeur florale discrète, beaucoup plus agréable (Rayne et Eggers, 2007a).

Différentes méthodes étaient mises en œuvre pour mettre au point un essai enzymatique de l'activité 4-EPMH. Les résultats ont été confirmés par HPLC mais la technique mérite encore d'être optimisée afin de devenir une méthode utile dans chaque cave à vin. En effet, ce protocole est rentable, assez facile à utiliser et est quantitatif dans la plage de 0-2 mg.L⁻¹ de 4-éthylphénol. La 4-EPMH s'est montrée utile pour détecter la présence de 4-éthylphénol dans le vin. Elle offre donc un nouveau moyen diagnostique pour mettre spécifiquement en évidence une contamination de cuve par *B. bruxellensis* et permettrait de remplacer certaines techniques actuelles, souvent chères, lentes et/ou peu spécifiques (numération sur boîte, PCR, GC/MS...).

Conclusions générales et perspectives

Avant de présenter les conclusions de cette étude, il est important de rappeler quelques points essentiels mis en évidence par l'étude bibliographique :

- Aucune étude sérieuse n'a analysé le risque de la présence d'éthylphénols dans les vins libanais.
- Très rares sont les études qui s'intéressent à la compréhension de la consommation de l'acide *p*-coumarique par *Brettanomyces*. La majorité des travaux cités dans la littérature suit uniquement l'apparition des éthylphénols.
- Le devenir dans la fermentation et le vin de cet acide *p*-coumarique, connu comme étant le précurseur des molécules engendrant les défauts phénolés, est lui aussi sujet à différentes hypothèses : adsorption, autres voies métaboliques, stabilité chimique dans un milieu vin... L'estimation de la quantité participant réellement à la bioconversion est alors difficile et les rendements de conversion qui en découlent sont très divers en fonction des études.
- Cet acide, comme tout autre composé chimique, possède 2 formes d'isomères géométriques. Dans le vin, ces 2 formes sont présentes mais à des proportions différentes. Est-ce que la bioconversion par *Brettanomyces* possède les mêmes profils cinétiques pour les 2 formes ? Quel est l'impact sur la quantité de 4-éthylphénols produite ?
- Les levures *Brettanomyces* pourraient adsorber l'acide *p*-coumarique sur leurs parois. Cette capacité d'adsorption dépend-t-elle de la nature ou de l'origine des souches ?
- La bioconversion est régie par un processus enzymatique comportant 2 enzymes. Existe-t-il des différences au niveau de leurs activités en fonction des souches ?
- De nombreuses techniques ont été élaborées pour tenter de détecter la présence de *Brettanomyces* dans les vins, de la culture sur boîte de pétri à la quantification du 4-éthylphénol par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS), en passant par la PCR (Polymérase Chain Reaction). Cependant, chaque méthode disponible à l'heure actuelle présente des inconvénients non négligeables (coût élevé, longue durée de réponse, faux négatifs et faux positifs...) empêchant de réellement conclure quant à la contamination d'un vin.

La première partie de ce travail a été d'estimer le risque de contamination des vins rouges dans les étapes post-fermentaires et même après la mise en bouteille dans l'industrie viticole au Liban.

A l'issue du **Chapitre III**, un certain nombre d'avancées ont été réalisées :

Les vins rouges libanais présentent des teneurs élevées en acide *p*-coumarique par rapport aux autres vins étudiés dans la littérature et provenant de différentes régions. Au cas où la levure *Brettanomyces* serait présente, ces fortes teneurs induiraient assurément plusieurs milligrammes de 4-éthylphénols. La recherche de ces derniers a montré que 15 % des échantillons contiennent ce composé avec des niveaux dépassant parfois le seuil de perception.

Des échantillons sélectionnés ont alors subi un dépistage microbiologique afin de vérifier la présence d'un développement levurien responsable de la présence de ces molécules. Le milieu de culture favorise le développement de levures non-*Saccharomyces* telles que *Brettanomyces*. Un autre milieu solide sélectif permettant de tester le caractère acidifiant des levures présentes d'une part et leur aptitude à convertir l'acide *p*-coumarique en 4-éthylphénol (« sniffing ») d'autre part, a détecté des *Brettanomyces* pour la première fois dans les vins libanais mais en pourcentage assez faible (3 %).

Cet étalement sur gel nous a permis de récupérer des colonies isolées qui ont été soumises à des tests génétiques. Ainsi des identifications par PCR spécifique pour *Brettanomyces* nous a permis de confirmer en premier lieu l'appartenance des souches isolées à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*. La technique de PCR-RFLP employée ainsi que le séquençage génétique ont révélé des profils différents entre des isolats d'origine libanaise et des souches isolées en France.

La comparaison de la caractérisation cinétique des réactions de bioconversion de différentes souches (3 libanaises et 2 françaises) a fait l'objet du **Chapitre IV**.

Les étapes réactionnelles de la bioconversion se sont montrées complexes. Le rendement en 4-éthylphénol dépend de phénomènes physico-chimiques, biochimiques et métaboliques. Les principales conclusions des expérimentations de suivi cinétique sont détaillées ci-après :

- L'analyse des 3 constituants de la bioconversion dans le milieu extracellulaire a été faite par la vérification du bilan matière à chaque point de l'analyse. Ce bilan ne s'est pas montré stable à la quantité d'acide théorique initialement ajoutée. Il présente une diminution (manque de matière) qui pourrait s'expliquer par l'adsorption d'acide *p*-

coumarique sur les parois des levures *Brettanomyces*. Ce phénomène semble être souche-dépendant. Les hypothèses d'accumulation de l'un des constituants dans le milieu intracellulaire ont été aussi évoquées.

- Les vitesses spécifiques de consommation de l'acide sont variables entre les souches. L'activité de l'enzyme hydroxycinnamate décarboxylase ne semble pas être limitante dans nos conditions de fermentation au contraire de l'enzyme vinylphénol réductase. Les vitesses spécifiques de productions sont aussi différentes et c'est spécialement les rendements de transformation de l'acide disponible (non-adsorbé) qui varient de 55 à 92 %.
- La forme *cis* de l'acide *p*-coumarique est moins convertie que la forme *trans* pour 2 souches testées, différentes génétiquement. Son entrée dans la cellule ou sa décarboxylation par l'enzyme hydroxycinnamate décarboxylase se fait moins bien. L'étape liée à l'activité de l'enzyme réductase se fait également moins bien et le rendement en produit paraît plus faible dans le cas du *cis*.
- La présence initiale du 4-vinylphénol présente un phénomène complexe. Sa bioconversion est plus faible que dans le cas où l'acide *p*-coumarique était le réactif initial. L'activité vinylphénol réductase semble être plus faible que la cinnamate ou elle peut être ralentie à cause du propylène glycol dans lequel le 4-vinylphénol est commercialement conditionné.

Dans le **Chapitre V**, nous avons pu montrer que les ions ammonium sont nécessaires pour un bon développement de la population de *Brettanomyces* dans le milieu de fermentation et que son absence ralentit la production de 4-éthylphénol. En revanche, la croissance et la bioconversion ont été totalement inhibées pour un excès de sulfate d'ammonium (10 g.L⁻¹).

Les liens entre population/production de 4-éthylphénol/pH ont également été étudiés. La quantité d'acide qui disparaît du milieu est dépendante de la concentration de la biomasse initiale. De même, la quantité finale de 4-éthylphénol est plus importante d'autant plus que la concentration de levures est élevée dans le milieu. Nous avons également montré que le pH a un effet sur les souches et influence les capacités d'adsorption.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à une application technologique, le but étant d'aboutir à un kit commercial (simple, rapide, efficace et peu coûteux) qui facilite la détection

des *Brettanomyces* dans le contexte œnologique en établissant un lien entre contamination et production d'éthylphénols.

Quelques perspectives à cette étude peuvent être proposées :

- Poursuite des études sur le risque éthylphénol dans le vignoble libanais avec la caractérisation de la microflore du raisin (pellicule des baies) et du sol libanais afin de retrouver l'origine des *Brettanomyces* isolées qui se sont montrées spécifiques par rapport aux autres souches répertoriées dans les bases de données.
- L'étude des phénomènes adsorption/désorption de l'acide *p*-coumarique sur les parois de *Brettanomyces* est également à poursuivre.
- L'enzyme 4-EPMH pourrait-elle offrir un nouveau moyen diagnostique pour mettre spécifiquement en évidence une contamination de cuve par *Brettanomyces* et permettrait-elle de remplacer certaines techniques actuelles, souvent chères, lentes et/ou peu spécifiques? L'utilisation de la 4-EPMH comme un traitement curatif pour les cuves contaminées est une piste concernant la résolution des défauts phénolés dans les vins. Cette enzyme possède la capacité de réduire le 4-éthylphénol en un produit présentant un arôme floral.
- Déterminer l'emplacement de l'enzyme vinylphénol réductase afin de comprendre les voies de métabolisation qui aboutissent aux 4-éthylphénols et par conséquent la compréhension des phénomènes qui empêchent la vérification du bilan matière de la réaction.
- Une piste de travail concerne la stabilité de l'acide *p*-coumarique en fonction de la lumière du jour et de la température ambiante. En quoi cet acide peut-il se dégrader? Quel est le produit qui se forme? Et quel est le devenir de la bioconversion?

**Références
bibliographiques**

A

ACS (1980). Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, *Analytical chemistry*, 52, 14, 2242-2249

Aguilar-Uscanga, M.G., Delia, M.L. & Strehaiano, P. (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1046-1050.

Alonso, A.M., Guilleán, D. A. Barroso, C.G., Puertas, B. & Garcia A. (2002). Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5832-5836.

Arvick, T.J. & Henick-Kling, T. (2002). Overview of *Brettanomyces*, its occurrence growth and effect on wine flavors. *Proceeding of 31st Annual New York Wine Industry Workshop*. April 3-5. pp. 117-123. Reprint with permission from Practical Winery and Vineyard, May-June 2002.

Avar, P., Nikfardjam, M.S.P., Kusaji-Mate, S., Montsko, G., Szabo, Z., Boddi, K., Ohmacht, R. & Mark, L. (2007). Investigation of Phenolic Components of Hungarian Wines. *International Journal of Molecular Science*, 8, 1028-1038.

B

Baranowski, J.D., Davidson, P.M., Nagel, C.W. & Baren A.L. (1980). Inhibition of *Saccharomyces* by naturally occurring hydroxycinnamates. *Journal of Food Science*, 45, 592-594.

Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2006). Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (2), 133-138.

Barbin, P. (2006). Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Barbin, P., Gilis, J.F., Strehaiano, P. & Taillandier, P. (2007). Facteurs favorisant le développement de *Brettanomyces* à la vigne et au cours de la vinification. In "OENO 2007": 8^{ème} Symposium International d'Enologie de Bordeaux.

Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow D. (1990) In *Yeast : characterization and identification*. 2nd edition. Cambridge University Press (Ed.). Cambridge, New York, Port Chester, Sydney.

Barthelmebs, L., Divies, C. & Cavin, J.F. (2000a). Knockout of the p-coumarate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus Plantarum* Reveals the Existence of two other inducible Enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3368-3375.

Barthelmebs, L., Lecomte, B., Divies, C. & Cavin, J.F. (2000b). Inducible Metabolism of Phenolic Acids in *Pediococcus pentosaceus* is Encoded by an Autoregulated Operon Which Involves a New Class of Negative Transcriptional Regulator. *Journal of Bacteriology*, 182 (23), 6724-6731.

Basha, S. M., Musingo, M. & Colova, V.S. (2004). Compositional differences in the phenolics compounds of muscadine and bunch grape wines. *African Journal of Biotechnology*, 10 (3), 523-528.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. & Lebrihi A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5), 1038-1044.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. & Suárez-Lepe, J.A. (2006). Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos mediante el uso de medios selectivo-diferenciales. *Tecnología del vino*, 32, 27-31.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. & Suárez-Lepe, J.A. (2009a). A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* population in wines. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1743-1751.

Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F. & Suárez-Lepe, J.A. (2009b). Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine. *Journal of Food Science*, 74, 15-22.

Betés-Saura, C., Andres-Lacueva, C. & Lamuela-Raventos, R.M. (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Pened'es by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 3040-3046.

Blaise, A. (1998). Altérations organoleptiques des vins. In *Oenologie, Fondements Scientifique et Technologiques*, Flanzky, C., Ed. Tec & Doc Lavoisier: Paris, 1182-1216.

Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York.

Brandam, C., Castro-Martínez, C., Délia, M.L., Ramón-Portugal, F. & Strehaiano, P. (2008). Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Canadian Journal of Microbiology*, 54 (1), 11-8.

C

Caboni, P., Sarais, G., Cabras, M. & Agoini, A. (2007). Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wine by LC-MS-MS and HPLC-DAD-fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7288-7293.

Cabrita, M.J., Palma, V., Patão, R. & Freitas, A.M.C. (2012). Conversion of hydroxycinnamic acids into volatile phenols in a synthetic medium and in red wine by *Dekkera bruxellensis*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 32(1), 106-111.

Carillo, J.D., Garrido-López, A. & Tena, M.T. (2006). Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-massspectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1102, 25-36.

Castillo-Sánchez, J.X., García-Falcón, M.S., Garrido, J., Martínez-Carballo, E., Martins-Dias, L.R. & Mejuto, X.C. (2008). Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106, 18-26.

Chad, Y. (2010). The « Brettanomyces project ». <http://brettanomyces.wordpress.com/>

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N. & Pons, M. (1992a). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60 (2), 165-178.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D. & Boidron, J.N. (1992b). Le caractère phénolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte. *Revue Française d'Œnologie*, 138, 21-24.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D. & Boidron, J.N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 463-468.

Chatonnet, P., Viala, C. & Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 443-448.

Chatonnet, P. (2012). *Brettanomyces* Mythes et Réalités. *Revue des Œnologues*, 144, 42-48.

Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H. & Voilley, A. (2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, 91 (1), 39-44.

Ciani, M. & Ferraro, L. (1997). Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 489-495.

Ciani, M., Maccarelli, F. & Fatichenti, F. (2003). Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 419-422.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R. & Comi, G. (2004). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1347-1355.

Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T. & Bisson, L.F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 139-147.

Coulter, A, Robinson, E, Cowey, G, Francis, I.L., Lattey, K, Capone, D, Gishen, M. & Godden, P. (2003). Dekkera/Brettanomyces yeast - An overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control. In: *Grapegrowing at the Edge: Managing the Wine Business - Impacts on Wine Flavour*. Proceedings of a seminar (July 11, 2003), Tanunda, Australia, pp. 41-50.

Couto, J.A., Neves, F., Campos, F. & Hogg, T. (2005). Thermal inactivation of the wine spoilage yeast Dekkera/Brettanomyces. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 337-344.

Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W. & de Barros Lopes, M.A. (2007). Genetic diversity of Dekkera bruxellensis yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research*, 7, 471-481.

Curtin, C.D., Borneman, A.R., Chambers, P.J. & Pretorius, I.S. (2012). De-Novo Assembly and Analysis of the Heterozygous Triploid Genome of the Wine Spoilage Yeast Dekkera bruxellensis AWRI1499. *Plos one*, 7 (3), e33840.

Cynkar, W C.D., Damberg, B., Janik, L., Gishen, M. (2006). Feasibility study on the use of head space mass spectrometry electronic nose (MS e_nose) to monitor red wine spoilage induced by Brettanomyces yeast. Adelaide: The Cooperative Research Center for Viticulture.

D

Davaux, F. & Renard, R., (2001). Rôle de certains paramètres viticoles sur les teneurs en précurseurs de phénols volatils par Brettanomyces. *Compte rendu de l'ITV France Midi-Pyrénées*.

De Beer, D., Joubert, E., Marais, J., Van Schalkwyk, D. & Manley, M. (2006). Climatic Region and vine structure: Effect on Pinotage wine phenolic composition total antioxidant capacity and colour. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27 (2), 151-163.

Del Álamo, M., I. Nevares, Cárcel, LM., Crespo, R. & Gonzalez-Muñoz, C. (2010). Wine ageing in controlled permeability HDPE tanks. *Food innova: International conference on food innovation*. Universidad Politécnica De Valencia. 25-29 october 2010.

Del Barrio-Galán, R., Ortega-Heras, M., Sánchez-Iglesias, M. & Pérez-Magariño, S. (2012). Interactions of phenolic and volatile compounds with yeast lees, commercial yeast derivatives and non-toasted chips in model solutions and young red wines. *European Food Research and Technology*, 234 (2), 231-244.

Delaherche, A., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of Brettanomyces bruxellensis and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5), 910-915.

Dias, L., Pereira-Da-Silva, S., Tavares M., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2003a). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast Dekkera bruxellensis in enological conditions. *Food Microbiology*, 20, 377-384.

Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro V. (2003b). Identification of yeasts isolated from wine related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 20, 567-574.

Díez, J., Domínguez, C., Guillén, D.A., Veas, R. & Barosso, C.G. (2004). Optimisation of stirbarsorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1025, 263-267.

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S. & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 862-871.

Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R. & Bayonove, C. (1993). Role of cinnamoyl esterase-activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41 (11), 2092-2096.

Dugelay, I., Baumes, R., Gunata, Z., Razungles, A. & Bayonove, C. (1995). Aroma evolution during wine aging - Formation of 4-(1-ethoxyethyl)-phenol and 4-(1-ethoxyethyl)-gäïacol. *Sciences des Aliments*, 15 (5), 423-433.

E

Edlin, D., Narbad, A. & Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 125, 311-316.

Edlin, D., Narbad, A., Gasson, M.J., Dickinson, J.R., & Lloyd, D. (1998). Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme Microbial Technology*, 22, 232-239.

Egli, C.M., Mitrakul C. & Henick-Kling, T. (1999). Molecular identification methods of *Brettanomyces* yeasts. *Proceedings of the 12th International Enology Symposium (31May-2June)*, Montréal, Canada. Ed. E. Lemperle, 201-217.

Egli, C.M. & Henick-Kling, T. (2001). Identification of *Brettanomyces*/*Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 241-247.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcriber spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.

Etievant, P.X. (1981). Volatile Phenol Determination in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 65-67.

Etievant, P.X., Issanchou, S.N., Marie, S., Ducruet, V. & Flanzzy, C. (1989). Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma - Influence of carbonic maceration and time of storage. *Sciences des Aliments*, 9 (1), 19-33.

F

Fariña, L., Boido, E., Carrau, F. & Dellacassa, E. (2007). Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1157, 46-50.

Fernández de Simón, B., Hernández, T., Cadahía, E., Dueñas, M. & Estrella, I. (2002). Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 216, 150-156.

Floridi, S., Montanari, L. Marconi, O. & Fantozzi, P. (2003). Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1548-1554.

Fugelsang, K. & Zoecklein, B. (2003). Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *American Journal for Enology and Viticulture*, 54 (4), 294-300.

G

Galzy, D.M. & Rioux, J.A. (1955). Observations sur quelques vins atteints de la maladie de « la fleur » dans le Midi. *Progress Agricole et Viticole*, 144, 365-370.

Gambelli, L. & Santaroni, G.P. (2003). Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 613-618.

Gancedo, C. & Serrano, R. (1989). Energy yielding metabolism. In: *The Yeasts: Metabolism and Physiology of Yeasts*. 2nd ed. Vol. 3. Rose A. H. and Harrison J. S. Academic Press Limited. London. 205-251.

Garcia, A.A., Grande, B.C. & Gandara, J.S. (2004). Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*, 1054, 175-180.

Garcia-Sanchez, F., Carnero, C., Heredia, A. (1988). Fluorometric Determination of p-coumaric Acid in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 80-82.

Gerbaux, V., Vincent, B. & Bertrand, A. (2002). Influence of maceration, temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 131-137.

Gerbaux, V. (2007). Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux. *Revue des Œnologues et des Techniques Vitivinicoles et Œnologiques: Magazine Trimestriel d'Information Professionnelle*, ISSN 0760-9868, Vol. 34, N° 123, p. 21-24.

Gerbaux, V. & Berger, J.L. (2009). Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie. *Bulletin de l'OIV*, Vol. 82, N° 941/942/943, pp. 357-366.

Gerland, C. (2010). Prévention des déviations phénolées provoquées par *Brettanomyces*, www.infowine.com - Revue Internet de Viticulture et Œnologie, N° 4/1.

Godoy, L., Garrido, D., Martínez, C., Saavedra, J., Combina, M., & Ganga, M. (2009). Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 452-457.

Godoy, L., Martínez C., Carrasco, N. & Ganga, M. (2008). Purification and characterization of a p-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 6-11.

Goldberg, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., & Soleas, G.J. (1998). Quercetin and p-coumaric acid concentrations in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 142-151.

Gondé, P., Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A. & Galzy, P. (1982). Selection of yeast strains for cellobiose alcoholic fermentation. *Journal of Fermentation and Technology*, 60, 579-584.

Goode, J. & Harrop, S. (2008). Wine faults and their prevalence: data from the world's largest blind tasting, 16^{èmes} Entretiens Scientifiques, Lallemand, Horsens.

Gilis, J.F. (1999). Etude de Contaminations de Fermentations Alcooliques Industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).

Goldsworthy, A. (1993). Pre-fermentation maceration of Pinot noir wine. Master Thesis (Applied Science). Lincoln University, New Zealand.

Guedes de Pinho, P. (1994). Caractérisation des vins de la région de Vinhos Verdes au Portugal. Reconnaissance chimique et sensorielle des vins de cépages blancs non *Vitis vinifera*. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 2 (France).

Guillamón, J., Sabaté, J., Cano, E.B.J. & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.

Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., Alexandre, H., Charpentier, C. & Feuillat, M. (2001). Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* in wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 35, 157-164.

H

Hansen, E.H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C. & Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 541-547.

- Harris, V., Ford, C.M., Jiranek, V. & Grbin, P.R. (2009).** Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 1117-1127.
- Hayasaka, Y, Baldock, G.A. & Pollnitz, A.P. (2005).** Contributions of mass spectrometry in the Australian Wine Research Institute to advances in knowledge of grape and wine constituents. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11 (2), 188-204.
- Hayes, P.J., Smyth, M.R. & Mc Murrough, I. (1987).** Comparison of Electrochemical and Ultraviolet Detection Methods in High-Performance Liquid-Chromatography for the Determination of Phenolic-Compounds Commonly Found in Beers. Optimization of Operating Parameters. *Analyst*, 112, 1197-1204.
- Heatherbell, D., Dicey, M., Goldsworthy, S. & Vanhanen, L., (1997).** Effect of prefermentation cold maceration on the composition, colour and flavor of Pinot noir wine. *Proceedings of the New Zealand Grape & Wine Symposium*, G.F. Steans (Ed.): 30-42.
- Henick-Kling, T., Arvik, T. & Conterno, L. (2004).** Genetic Diversity among *Brettanomyces* (*Brettanomyces* Seminar, ASEV 2004 Annual Meeting). *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 302A.
- Henschke, P, Bellon, J, Capone, D, Coulter, A, Cowey, G, Cozzolino, D, Curtin, C, Field, J, Gishen, M, Graves, P, Latey, K, Robinson, E, Francis, I.L., de Barros Lopes, M. & Godden, P. (2004).** Incidence and control of *Brettanomyces*: The Australian perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (3), 304A.
- Heresztyn, T. (1986a).** Metabolism of volatile phenolic-compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*, 146 (1), 96-98.
- Heresztyn, T. (1986b).** Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 127-132.
- Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Alvarez, P.J. & Moreno-Arribas, M.V. (2006).** Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, 563, 116-125.
- Hesford, F., Schneider, K., Porret, N. & Gafner, J. (2004).** Identification and analysis of 4-ethylcatechol in wines tainted by *Brettanomyces* off-flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (3), 304A.
- Hisomoto, M., Okuda, T., Nishimoto, S., Tani, K., Tachibana, M., Koizumi, H., Kiba, N. & Yokotsuka, K. (2009).** Determination of 4-vinylcatechol in wine by HPLC-DAD coupled with fluorescence detection. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 402.
- Ho, P., Hogg, T.A. & Silva, M.C.M. (1999).** Application of chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food chemistry*, 64, 115-122.

Hoffman, C.S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57 (2-3), 267-272.

I

Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., & Jimenez, J. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 998-1003.

Ibern-Gomez, M., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M. & Waterhouse, A.L. (2002). Rapid HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (3), 218-221.

IFV, Institut Français de la vigne et du vin, Outils en ligne, Fiches levures, Identification de microorganismes. (<http://www.vignevin.com/outils-en-ligne/fiches-levures/identification-des-micro-organismes.html>)

IFV, Institut Français de la vigne et du vin, Fiche pratique, Azote ammoniacal en œnologie. (<http://www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/azote-mouts.php>)

J

Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak., G., Abranko, L., Koellensperger, G. & Hann, S. (2010). LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, 22, 366-372.

James, S. A., Collins, M. D. & Roberts, I. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 189-194.

Jandera, P., Skerikova, V., Rehova, L., Hajek, T., Baldrianova, L., Skopova, G., Kellner, V. & Horna, A. (2005). RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a Coulometric Array detector. *Journal of Separation Science*, 28, 1005-1022.

Jin, Z.M., He, J.J., Bi, H.Q., Cui, X.Y. & Duan, C.Q. (2009). Phenolic Compound Profiles in Berry Skins from Nine Red Wine Grape Cultivars in Northwest China. *Molecules*, 14, 4922-4935.

K

Kilmartin, P.A. (2001). Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols. *Antioxidants and Redox Signaling*, 3, 941-955.

Kondakova V., Tsvetkov I., Badjakov I., Dzhabazova T., Slavov S. (2009). Phenol compounds - qualitative index in small fruits. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23 (4), 1444-1448.

K O'Toole, D. & Kun Lee, Y. (2006). Food involving yeast and ethanol fermentation (Chapter 8) In: *Microbial biotechnology: principles and applications*, Ed. Kun Lee, Y.. World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd. Publisher.

Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (2000). (4th ed. revised). *The yeasts. A taxonomic study.* Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam, The Netherlands.

L

Laforgue, R. & Lonvaud-Funel, A. (2012). Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability. *Food Microbiology*, 32, 230-234.

Larcher, R., Nicolini, G., Puecher, C., Bertoldi, D., Moser, S. & Favaro, G. (2007). Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with acoulometric array detector. *Analytica Chimica Acta*, 582, 55-60.

Lavigne, V. & Dubourdieu, D. (1996). Mise en évidence et interprétation de l'aptitude des lies à éliminer certains thiols volatils du vin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 30(4), 201-206.

Licker, J.L., Acree, T.E. & Henick-Kling, T. (1998a). What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. In: Waterhouse, A.L. & Ebeler, S.E. (eds). *Chemistry of wine flavour.* ACS symposium series. Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 96-115.

Licker, J.L. (1998b). The sensory analysis and gas chromatography olfactometry (GCO) of wines with "*Brett*" flavor. Master's thesis, Cornell University.

Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp. Chapter 13. In: Blackburn, C. de W. (ed). *Food spoilage microorganisms.* Woodhead Publishing Ltd, Abington, Cambridge, UK. pp. 353-398.

Lunte, C.E., Wheeler, J.F. & Heineman, W. R. (1988). Determination of Selected Phenolic-Acids in Beer Extract by Liquid-Chromatography with Voltammetric - Amperometric Detection. *Analyst*, 113, 95-98.

M

Mansfield, A.K., Zoecklein, B.W. & Whiton, R.S. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 303-307.

Martorell, N., Martí, M.P., Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2002). Determination of 4-ethylguaicol and 4-ethylphenol in red wine using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 978, 349-354.

Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernandez-Espinar, M.T., Loureiro, V. & Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 79-84.

Medawar, W. (2003). Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte œnologique. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France) et de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth (Liban).

Medawar, W., Strehaiano, P. & Delia, M.L. (2003). Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiology*, 20, 527-532.

Meilgaard, M., Civille, G.V. & Carr, B.T. (1999). Sensory evaluation techniques. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.

Millet, V. & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 136-141.

Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T. & Egli, C.M. (1999). Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology*, 16, 3-14.

Monje, M., Privat, C., Gastine, V & Nepveu, F. (2002). Determination of ethylphenol compounds by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, 458, 111-117.

Moreno, M.V.G. & Barroso, C.G. (2002). Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7556-7563.

N

Nisiotou, A.A. & Gibson, G.R. (2005). Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 454-464.

Noble, A.C. (1996). Taste-aroma interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (12), 439-444.

O

Oelofse, A., Pretorius, I.S. & Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 128-144.

Oliver, J.D. (1993). Formation of viable but nonculturable cells. In: Kjelleberg, S. (ed). *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York. pp. 239-271.

Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, M.L. & Simpson, L.M. (1995). Entry into and resuscitation from the viable but non culturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2624-2630.

O'Neill, F.H., Christov, L.P., Botes & P.J., Prior, B.A. (1996). Rapid and simple assay for feruloyl and p-coumaroyl esterases. *World journal of microbiology and biotechnology*, 12, 239-242.

Ong, B.Y. & Nagel, C.W. (1978). High-pressure liquid-chromatographic analysis of hydroxycinnamic acid, tartaric acid-esters and their glucose esters in *Vitis vinifera*. *Journal of Chromatography A*, 157, 345-355.

Oxenham, A. (2007). La cytométrie de flux : un nouvel outil pour le dénombrement de *Brettanomyces* et la prévention de caractère phénolé dans les vins. Mémoire présentée en vue de l'obtention du diplôme national d'œnologue.

Ozkan, G. & Baydar, N. (2006). A direct RP_HPLC Determination of phenolic compounds in Turkish red wines. *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, 19 (2), 229-234.

P

Peña-Neira, A., Hernández, T., García-Vallejo, C., Estrella, I., Suárez, J. A. (2000). A survey of phenolic compounds in Spanish wines from different geographical origins. *European Food Research and Technology*, 210, 445-448.

Pérez-Magariño, S. & González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96, 197-208.

Peynaud, E. & Domercq, S. (1956). Sur les *Brettanomyces* isolés de Raisins et de Vins. *Archiv für Mikrobiologie*, 24, 266-280.

Phister, T.G. & Mills, D.A. (2003). Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7430-7434.

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N. & González Sáiz, J.M. (2007). Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1143, 176-181.

Pizarro, C., Sáenz-González C., Pérez-del-Notario N. & González-Sáiz, J.M. (2011). Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1576-1584.

Pollnitz, A.P., Pardon, K.H. & Sefton, M.A. (2000a). Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *Journal of chromatography A*, 874, 101-109.

Pollnitz, A.P., Pardon, K.H. & Sefton, M.A. (2000b). 4-Ethylphenol, 4-ethylguaiaicol and oak lactones in Australian red wines. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 438, 45-52.

Pozo-Bayón, M., Hernández, M., Martín-Álvarez, P. & Polo, M. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 2089-2095.

R

Rayne, S. & Eggers, N. (2007a). Volatile phenols from *Brettanomyces* in barreled red wines: are they stable? And where do they reside? *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 522, 64-69.

Rayne, S. & Eggers, N. (2007b). 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiaicol in wines from the Okanagan Valley, and the *Brettanomyces/Dekkera* connection. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 516, 52-59.

Reeve, C.D., Carver, M.A. & Hopper, D. J. (1989). The purification and characterization of 4-ethylphenol methylhydroxylase, a flavocytochrome from *Pseudomonas putida* JD1. *Biochemical Journal*, 263 (2), 431-437.

Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G. & Lonvaud-Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1208-1219.

Renouf, V. & Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiology Research*, 162, 154-167.

Rentzsch, M., Wilkens, A. & Winterhalter, P. (2009). Non-flavonoid Phenolic Compounds Chapter 9C, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science + Business Media, LLC.

Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 260-341.

Rodrigues, N., Goncalves, G., Perreira-Da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2001). Development and use of a differential medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 588-599.

Roland, A. (2010). Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire. Thèse de doctorat du centre international d'études supérieures en sciences agronomiques - Montpellier Supagro.

Romano, A., Perello, M., de Revel, G. & Lonvaud-Funel, A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (6), 1577-1585.

Russo, P., Navarro, A., Aguilar-Caballos, M., Fernandez-Romero, J. & Gomez-Hens, A. (2008). Analytical innovations in the detection of phenolics in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1858-1865.

S

Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.C. & Sangorrín, M.P. (2010). Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 170-176.

Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E. & Sangorrín, M.P. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28, 503-509.

Salameh, D. (2008). Bioconversion de l'acide p-coumarique par *Brettanomyces bruxellensis*: étude de la cinétique et analyse des étapes réactionnelles. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France) et de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth (Liban).

Salameh, D., Brandam, C., Medawar, W., Lteif, R. & Strehaiano, P. (2008). Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry*, 107 (4), 1661-1667.

Sanna, G., Ledda, S., Manca, G. & Franco, M.A. (2008). Characterization of the content of antioxidant substances in the wines of Sardinia. *Journal of Commodity Science, Technology and Quality*, 47 (I-IV), 5-25.

Scheffers, W. A. (1992). Contaminants in Baker's yeast, proceeding of the COMMET course on Microbial Contaminants. Helsinki 1991 and 1992. Ed. By M. Korhola and V. Bacstrom. *Research*, 7, 19-36.

Silva, P., Cardoso, H. & Geros, H. (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp.. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 65-72.

Sigma-Aldrich. 2007. MSDS Sheet for *p*-Coumaric Acid. Sigma-Aldrich.

Singleton, V.L., Timberlake, C.F. & Lea, A.G.H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 403-410.

Somers, T.C., Verette, E. & Pocock, K.F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis-vinifera* - Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymatic-hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40 (1), 67-78.

Stead, D. (1995). The effect of hydroxycinnamic acids and potassium sorbate on the growth of 11 strains of spoilage yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 82-87.

Steinke, R. D. & Paulson, M.C. (1968). The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 381-387.

Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B. & Coull, J. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 938-941.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102, 10-21.

Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P. & Duan, C. (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries, *Molecules*, 12, 679-693.

Swoboda, F. K. (1922). Nitrogen Nutrition of Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 52, 91-109.

T

Tchobanov, I. (2007). Sélection de souches de levures Bulgares. Purification partielle et caractérisation de la vinylphénol réductase chez *Brettanomyces*. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne.

Tchobanov, I., Gal L., Guilloux-Benatier, M.I., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., Serpaggi, V. & Alexandre, H. (2008). Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 284, 213-217.

Tessonniere, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H. & Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 237-243.

Thurston, P.A. & Tubb, R.S. (1981). Screening yeast strains for their ability to produce phenolic off-flavor. *Journal of the institute of brewing*, 87, 177-179.

Tian R., Pan Q., Zhan J., Li J., Wan S., Zhang Q. & Huang W. (2009). Comparison of phenolic acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times. *Molecules*, 14, 827-838.

V

Vanbeneden, N. (2007). Release of hydroxycinnamic acids and formation of flavour-active volatile phenols during the beer production process. Thèse de doctorat de Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Bio-ingenieurs wetenschappen.

Van Der Walt, J. P. (1970). The genus *Dekkera*. In: *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd ed. J. Lodda. North Holland Publ. Co. Amsterdam. 154-165.

Van Nedervelde, L. & Debourg, A. (1995). Properties of Belgian acid beers and their microflora - part II, *Cerevisiae and Biotechnologie*, 20, 43-48.

Van Ruth, S.M. (2001). Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering*, 17 (4-5), 121-128.

Vasserot, Y., Caillet, S. & Maujean, A. (1997). Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (4), 433-437.

Verscheure, M., Lognay, G. & Marlier, M. (2002). Revue bibliographique: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 6 (3), 131-142.

Vinci, G., Eramco, S., Nicoletti, I. & Restuccia, D. (2008). Influence of environmental and technological parameters on phenolic composition in red wine. *Journal of Commodity Science, Technology and Quality*, 47 (I-IV), 245-266.

Vončina, D. B., Razboršek, M. I. & Simonič, M. (2009). High-performance Liquid Chromatographic Determination of Selected Phenolic Acids in Wine. *Nova Biotechnologica*, 9-2, 113-118.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.

W

Wackerbauer, K., Kramer, P. & Siefert, J. (1982). Phenolische Aromastoffe in Bier. *Brauwelt*, 15, 618-626.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds). *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.

Woolfit, M., Rozpedowska, E., Piskur, J. & Wolfe, K.H. (2007). Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell*, 4, 721-733.

Y

Yeomans, M.R. (2006). Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiology and Behavior*, 89 (1), 10-14.

Z

Zoecklein B.W. (2000). Brettanomyces aroma/flavor research. Vinter's Corner. 15(1) <<<http://www.fst.vt.edu/Zoecklein/Janfeb00.html>>>

Annexes

ANNEXE I

Profils de bioconversion de l'acide *p*-coumarique par 2 souches de *Brettanomyces bruxellensis* (F1 et L2) à 4 concentrations différentes de population 10^5 - 10^6 - 10^7 - 10^8 levures.mL⁻¹ dans 4 milieux tamponnés à pH 2,6 - 3 - 3,4 - 4

Sur les courbes, l'axe des abscisses représente le temps en heures et l'axe des ordonnées représente la concentration en mmol.L⁻¹ de chacun des 3 constituants analysés.

(◇) acide *p*-coumarique, (□) 4-vinylphénol, (Δ) 4-éthylphénol, (x) bilan matière

