



HAL
open science

Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* : influence sur son potentiel d'altération des vins rouges

Alice Cibrario

► **To cite this version:**

Alice Cibrario. Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* : influence sur son potentiel d'altération des vins rouges. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0923 . tel-02170503

HAL Id: tel-02170503

<https://theses.hal.science/tel-02170503>

Submitted on 2 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : CENOLOGIE

par

Alice CIBRARIO

Diversité Génétique et Phénotypique de l'Espèce

Brettanomyces bruxellensis.

Influence sur son Potentiel d'Altération des Vins Rouges.

Sous la direction du Pr. Marguerite DOLS-LAFARGUE

Soutenue publiquement le 18 Décembre 2017

Membres du Jury

M. COTON Emmanuel	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
M. SCHACHERER Joseph	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme SERPAGGI Virginie	Chargée de Recherche, Inter Rhône, Orange	Examinatrice
M. de REVEL Gilles	Professeur, ISVV, Université de Bordeaux	Président du Jury
Mme DOLS-LAFARGUE Marguerite	Professeur, Bordeaux INP	Directrice de thèse

The answer to the Ultimate Question of Life, the Universe, and Everything:

'Forty-two, said Deep Thought, with infinite majesty and calm.'

The Hitchhiker's Guide to the Galaxy. Douglas Adams (1979).

*A ma mère et à ma sœur,
pour leur amour, leur brin de folie et leur indéfectible soutien.*

REMERCIEMENTS

Je tiens, avant toute chose, à remercier mon encadrante de thèse, Marguerite Dols-Lafargue, de m'avoir confiée ce projet. Merci pour sa confiance, son conseil scientifique, son écoute, et tous les bons moments partagés ensemble, jusque dans les coins reculés de l'Irlande. Travailler avec elle sur cette « fichue bestiole » a été un réel plaisir.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à Joseph Schacherer et à Emmanuel Coton, pour leurs rapports finaux. Merci à eux ainsi qu'à Virginie Serpaggi d'avoir fait le déplacement pour écouter ma soutenance ainsi que pour leurs questions très intéressantes. Enfin, un premier merci à Gilles de Revel d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Au cours de ce projet, sont intervenues de nombreuses personnes auxquelles je souhaite exprimer ma gratitude :

Je remercie ainsi Isabelle Masneuf-Pomarède et Warren Albertin pour leur accompagnement au cours de ces trois années. Merci à Isabelle de m'avoir expliquée les différentes problématiques associées à l'écologie du vin. Warren, un très grand merci pour les multiples scripts (R c'est la vie !), les nombreuses analyses et les discussions et idées que nous avons pu avoir ensemble.

Un très grand merci à Cécile Miot-Sertier pour son aide précieuse dans la réalisation des expériences de phénotypage ainsi que pour sa gentillesse et ses conseils. Ses oreilles bourdonnent peut-être encore du bruit de ces petits barreaux aimantés dans les nanofermenteurs.

Je remercie également Gilles de Revel de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de chimie analytique ainsi que pour les nombreuses discussions relatives au projet et au vin. Je remercie très chaleureusement Marie-Claire Perello pour son accueil dans ce laboratoire et pour son travail sur l'amélioration et la validation de la méthode de dosage des sucres du vin. Un grand merci également à Laurent pour sa gentillesse et sa patience face à mes questions incessantes (longue vie à son vélo !).

Je tiens également à remercier tous les châteaux et partenaires qui ont participé à ce projet. Merci à eux pour leur investissement vis à vis des plans d'échantillonnage ainsi que pour les nombreux échanges que nous avons pu avoir.

De manière générale, je remercie l'équipe des Bretty women pour ces 3 années passées ensemble : Marguerite, Marta, Isabelle, Warren, Cécile, Aline, Patricia et Marina. Un merci tout particulier à Aline Lonvaud de m'avoir accueillie dans son bureau et pour les riches échanges que nous avons pu avoir.

Un grand merci à l'ensemble des stagiaires qui sont intervenus au cours de ce projet de thèse : Mathilde, Hany, Martin, Jessica, Margot et Baptiste. Merci pour votre travail et votre investissement dans vos projets de stage respectifs ainsi que pour votre bonne humeur.

Merci aux membres de Microflora : Julie, Amélie, Rémi, Marie, Geoffrey et Marine, pour l'ensemble des analyses réalisées. Merci pour les très nombreuses discussions que nous avons eu.

Merci aux membres du laboratoire de microbiologie : Lucie, Cécile, Patricia, Claire, Patrick, Olivier, Fety, Johann pour votre accueil, vos conseils, votre gentillesse.

Merci à Emilien, Philippe, Margaux, Warren, Vikas, levuristes de l'Upper Yeast Side pour votre aide (cyto, matériels, souches, scripts...et j'en passe), ainsi que pour les quelques apéro-labos et blagues du café que nous avons partagé.

Ces trois années passées à l'ISVV ont donné lieu à de très belles rencontres et je souhaite ainsi remercier toutes celles et ceux qui, de passage ou non, ont été là pour les rires, les discussions, le soutien et les apéros nécessaires à toute bonne thèse.

Un million de merci à Marta Avramova, ma colocataire de bureau, mon binôme de travail et mon amie. Merci pour ces trois années : les expériences à quatre mains, les échanges à bâton rompu, les coups de foli dans le bureau, les Skype franco-australien, les boissons fermentées, le fromage, le canapé et les voisines, merci Bretty.

Un énorme merci à Margaux, Cécile et Marion : merci pour les milliers de moments partagés au cours de nos thèses, les sujets improbables abordés lors des repas du midi et l'amitié que nous avons construite. We made it !

Merci également à Julie pour ton écoute et les petites pauses quotidiennes qui se sont révélées indispensables au cours de ces trois années.

Enfin mille merci à Marie, Rémy, Fety, Mariette, Maroula, Blandine, Pauline, Fanny, Nicolas, Maxime, Yuli, Magalie, Lucie, Hugo, Sophie, Marine, Lucile, Téo, Jean-Sebastien, Axel, Jochen, Brendan, Ana, Louwrens, Marie, Mathilda, Marc, Guillermo...Merci pour l'ensemble des moments partagés et à venir.

Enfin, je souhaite citer mon entourage qui a également plus qu'entendu parler de cette thèse et participé par bien des aspects à celle-ci.

Charlie, Bruno, Gilou, Aline, Jade et Anaïs, merci d'avoir partagé ma vie et mon quotidien, ces dernières années. Nos expériences scientifiques, culinaires, sportives, la reine des neiges, l'ail, le piment, les nems, Balin Souchard, Lespiault SAS ne sont certainement que le début de nos aventures.

Merci également à mes amis bayonnais, bordelais et d'ailleurs : Caroline, Laetitia, Audrey, Danaulise, Maud, Thomas, Justine, Bixente, Pierre, Tanguy, Emilie, Mathilde, Fabien, Sidonie, Inès, Thibault, Camille, Romain, Pauline, Aurore, Clochette, Jean-François, François petit, JB dit Olive, Tristan, Jane... Merci à tous d'être aussi présents, de près ou de loin.

Enfin, un très très grand merci à ma famille, cousins et neveux d'être là au quotidien.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	I
Liste des figures	V
Liste des tableaux	XI
Introduction générale	1
<i>Revue bibliographique</i>	
1 Processus de vinification des vins rouges	6
1.1 Les étapes pré-fermentaires	6
1.2 La fermentation alcoolique	6
1.3 La fermentation malolactique	8
1.4 L'assemblage	8
1.5 L'élevage	9
1.6 Le collage et la mise en bouteille	10
1.7 Évolution de la composition glucidique du vin au cours de son élaboration	11
1.7.1 Le raisin et le moût	11
1.7.2 La fermentation alcoolique	11
1.7.3 La fermentation malolactique	12
1.7.4 L'élevage en barrique	13
2 Brettanomyces bruxellensis : généralités et physiologie	15
2.1 Les origines	15
2.2 Taxonomie et morphologie	15
2.3 Besoins nutritionnels et tolérance aux facteurs abiotiques	16
2.3.1 Tolérance aux facteurs abiotiques et état VNC	16
2.3.2 Assimilation de l'azote	18
2.3.3 Assimilation du phosphore	19
2.3.4 Vitamines et oligoéléments	19
2.3.5 Les sources carbonées	20
2.4 Métabolisme des substrats carbonés et croissance de <i>B. bruxellensis</i>	21
2.4.1 Métabolismes respiratoire et fermentaire	21
2.4.2 Ecarts à ces métabolismes « idéaux »	23
3 Diversité génétique de <i>B. bruxellensis</i>. Lien avec la variabilité phénotypique	30
3.1 Diversité génétique de <i>B. bruxellensis</i>	30
3.1.1 Caractéristiques	30
3.1.2 L'outil microsatellite pour étudier la diversité et la structure de la population	32
3.2 Origine de la variabilité génétique	33

3.2.1	Lien entre la niche écologique et la variabilité génétique	33
3.2.2	Lien entre l'origine géographique et la variabilité génétique	33
3.3	Effet de la variabilité génétique sur la physiologie de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	35
3.3.1	Effet sur la croissance et la tolérance aux milieux hostiles	35
3.3.2	Effet sur le métabolisme carboné	36
4	Contamination et altération des vins rouges par <i>Brettanomyces bruxellensis</i>.	37
4.1	Contamination des vins rouges par <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	37
4.1.1	Un peu d'histoire...	37
4.1.2	Les sources de contamination et de dissémination	37
4.2	Formation de phénols volatils et altération du vin	40
4.2.1	Définition des phénols volatils	40
4.2.2	Biosynthèse des phénols volatils	41
4.2.3	Analyse physiologique de la formation des phénols volatils	43
4.3	Méthodes de détection, de prévention et d'élimination de <i>B. bruxellensis</i> et des phénomènes d'altération dans le vin	46
4.3.1	Méthodes de détection de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> dans le vin	46
4.3.2	Méthodes de prévention et d'élimination	48
5	Problématique de thèse	51

Matériel et Méthodes

1	Mode de collecte des échantillons de vin dans des châteaux du vignoble bordelais	54
1.1	Partenariat avec des châteaux du vignoble bordelais	54
1.1.1	Objectifs	54
1.1.2	Conditions de prélèvement	55
1.1.3	Modes de collectes et traitement des échantillons	55
2	Microbiologie	59
2.1	Milieux	59
2.1.1	Milieux liquides	59
2.1.2	Milieux solides	60
2.2	Dénombrements	60
2.2.1	Détermination de la population viable et cultivable	60
2.2.2	Dénombrement sur cellule de Malassez	61
2.2.3	Détermination de la population par PCR quantitative	61
2.3	Isolements et mise en collection	62
2.3.1	Isolement à partir des échantillons de vin	62
2.3.2	Isolement à partir de glycérol stock	63
2.4	Souches	64
2.4.1	La collection	64
2.4.2	La collection génotypée	64

2.4.3	Les souches phénotypées	64
3	Techniques de biologie moléculaire pour le typage génétique	65
3.1	Extraction d'ADN	65
3.2	PCR TYPEBRETT	65
3.3	Electrophorèse capillaire sur micro-puce	66
3.4	PCR sur microsatellites	66
4	Méthodes de caractérisation phénotypiques	67
4.1	Consommation des sucres en milieu modèle	67
4.1.1	Préculture des souches	67
4.1.2	Phénotypage en « nanofermenteur »	68
4.1.3	Etude des cinétiques de croissance en plus grands volumes	70
4.1.4	Production de phénols volatils sur différents substrats carbonés	71
4.1.5	Croissance sur différents substrats carbonés avec 12 ou 14% d'éthanol	71
4.1.6	Suivi de la croissance	72
4.1.7	Traitement des prélèvements	72
4.2	Production de phénols volatils en milieu modèle	72
4.3	Phénotypage sur microplaques (système Biolog)	73
4.4	Expériences réalisées dans le vin	75
4.4.1	Protocole d'acclimatation	75
4.4.2	Préparation des vins	75
4.4.3	Suivi de la production de phénols volatils dans le vin	75
4.4.4	Effet de la température sur la croissance et la production de PVs dans le vin	76
5	Détermination des paramètres cinétiques de croissance	79
5.1	Profils de croissance	79
5.2	Calculs des paramètres de croissance	80
6	Méthodes d'analyse chimique	82
6.1	Dosage des sucres résiduels dans le vin par GC-FID	82
6.2	Mesure de la concentration de phénols volatils	85
6.3	Dosage de substrats par chromatographie liquide (HPLC)	86
7	Mise en place des capteurs au chai	87
8	Traitement des données et analyse statistique	87

Chapitre 1.

*Diversité génétique et dissémination de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin.*

1	La collection	90
2	Diversité génétique globale de l'espèce	92
3	Structuration de la population dans un contexte œnologique	95
3.1	Distribution des isolats du vin dans les groupes génétiques identifiés par Avramova et al. (2017)	95

3.2	Distribution géographique des groupes génétiques	97
3.3	Distribution des groupes génétiques dans le temps	101
4	Migration et dissémination des individus de l'espèce	102
4.1	Structuration de la population : génotypes et groupes de clone	102
4.2	Persistance temporelle des groupes de clones	103
4.3	Dissémination spatiale	105
>	Migrations à l'échelle du vignoble bordelais	109
5	Etude de cas à l'échelle d'un château	113
6	Discussion	116

Chapitre 2.

*Diversité phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* : métabolisme carboné et production de phénols volatils.*

Influence du groupe génétique et de l'origine écologique.

1	Diversité génétique et utilisation des sucres	121
1.1	Profils de croissance et d'utilisation des sucres en « nanofermenteur »	123
1.1.1	Profils de consommation	124
1.1.2	Profils de croissance	125
1.1.3	Conclusion	128
1.2	Profil d'utilisation d'un large panel de sources carbonées sur plaque Biolog	128
1.3	Comparaison des tests Biolog et « nanofermenteurs »	131
1.4	Caractéristiques de la croissance et du métabolisme en fonction des substrats carbonés	132
1.4.1	En présence de monosaccharides	132
1.4.2	En présence de disaccharides	137
1.4.3	Conclusions	140
1.5	Ordre de préférence des substrats carbonés chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	141
1.5.1	Glucose + monosaccharides	141
1.5.2	Glucose + disaccharides	143
1.5.3	Conclusion	146
2	Capacités d'altération de l'espèce <i>B. bruxellensis</i>	149
2.1	Capacités de production des phénols volatils en milieu modèle	149
2.1.1	Profils de croissance	151
2.1.2	Lien entre la production de phénols volatils et les profils de croissance	153
2.1.3	Analyse des cinétiques de production	155
2.1.4	Capacités spécifiques de production des souches	155
2.1.5	Analyse cinétique	157
2.2	Nature du substrat carbonée supportant la croissance de <i>B. bruxellensis</i> et production de phénols volatils en milieu défini.	159

2.3	Influence de l'éthanol et d'une privation d'oxygène sur <i>B. bruxellensis</i> en milieu synthétique de base	165
3	Discussion et conclusion	167

Chapitre 3.

Evolution de la composition en sucres des vins rouges du vignoble bordelais pendant la FML et l'élevage.

Evaluation du lien avec la production en phénols volatils

1	Mise en place du dosage de sucres résiduels dans le vin	172
2	Composition en mono- et disaccharides des vins rouges en fermentation malolactique	173
2.1	Echantillonnage sur la période « fermentations »	173
2.2	Analyse globale	174
2.3	Modifications de la composition en sucre associées à la FML	176
2.4	Facteurs modulant la composition en sucres lots de vins étudiés aux stades fermentaires	180
2.5	Bilan sur les changements observés pendant la FML	185
3	Evolution de la composition du vin en mono- et disaccharides pendant le 1^{er} été de l'élevage en barrique	186
3.1	Echantillonnage et suivi sur le premier été d'élevage.	186
3.2	Identification et quantification des oses présents	188
3.3	Facteurs affectant la variabilité entre les échantillons	190
3.4	Modifications de la composition en sucres observées entre deux soutirages pendant le premier d'été d'élevage	195
4	Existe-t-il un lien entre les profils en sucres des vins et la production de phénols volatils pendant l'élevage en barrique?	198
4.1	Analyse de l'altération par les phénols volatils par rapport à la contamination par <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	198
4.2	Production de phénols volatils et évolution de la composition en sucres	199
4.3	Résumé des résultats sur élevage	201
5	Discussion	201

Chapitre 4.

Brettanomyces bruxellensis dans les vins rouges : développement et altération.

Influence de la température et du groupe génétique.

1	Influence de la température sur le développement de <i>B. bruxellensis</i> dans les vins rouges	207
1.1	Mesure des températures dans les chais d'élevage	208
1.2	Impact de la température sur le développement de <i>B. bruxellensis</i> dans le vin au laboratoire : suivi mensuel	210
1.3	Cinétiques de production de phénols volatils : suivi mensuel	213

1.4	Effet du taux d'inoculation et de la température sur la croissance	215
1.4.1	Effets du taux d'inoculation et de la température sur la croissance	215
1.4.2	Effet du taux d'inoculation et de la température sur la cinétique de production	218
1.5	Etude physiologique avec un suivi hebdomadaire	221
1.6	Conclusion	224
2	Influence du groupe génétique sur le développement de <i>B. bruxellensis</i> et la production de phénols volatils dans les vins rouges	224
	Conclusion	231
	Références bibliographiques	236
	Annexes	262
	Valorisation des travaux de recherche	315

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide desoxyribonucléique

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

ARN : Acide ribonucléique

AHC: Acide hydroxycinnamique

ATP : Adénosine triphosphate

Brettanomyces bruxellensis - B. bruxellensis

CS : Cabernet-Sauvignon

DMDC : Diméthyl dicarbonate

DO : Densité optique

EPs: Ethyl phénols

FA : Fermentation alcoolique

FAD/FADH₂: Flavine adénine dinucléotide

FISH: Fluorescence In Situ Hybridation, *hybridation in situ en fluorescence*

FML : Fermentation malolactique

GC : groupe de clone

GC - FID: Gaz Chromatography -Flame Ionisation Detection, *chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme*

GC-MS : Gaz Chromatography - Mass Spectrometry, *chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse.*

HPLC : High Performance Liquid Chromatography, *chromatographie liquide à haute performance*

JR : Jus de raisin

LSA : Levures Sèches Actives

LT : Levures totales

MD : Milieu défini

MPF : Macération pré-fermentaire

MS : Mass spectrometer, *spectromètre de masse*

Mt : Merlot

NAD⁺/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NS : Non-*Saccharomyces*

Oenococcus oeni - *O. oeni*

Pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction, *réaction en chaîne par polymérase*

qPCR : PCR quantitative

PNA : Peptide Nucleic Acid, *acide nucléique peptidique*

PVs : Phénols Volatils

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA, *amplification aléatoire d'ADN polymorphe*

REA-PFGE: Restriction Endonuclease Analysis using Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *analyse des profils de restriction endonucléasique en utilisant l'électrophorèse en champ pulsé*

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, *polymorphisme de longueur des fragments de restriction*

RI : Refractive Index (detector), *détecteur d'indice de réfraction*

rpm : Révolution par minute

Saccharomyces cerevisiae - *S. cerevisiae*

SP: Seuil de perception

SPME : Solid phase microextraction, *microextraction sur phase solide*

SR: Seuil de rejet

TAE : Tampon tris-acétate-EDTA

Tm : Température d'hybridation

uDO : Unité de densité optique

UFC : Unité formant colonie

VNC : Viable mais Non Cultivable

VPs : Vinyl phénols

v/v : Volume par volume

YPG : Yeast Peptone Glucose

4EP : 4-éthylphénol

4EG : 4-éthylguaiacol

4EC : 4-éthylcatéchol

4VP : 4-vinylphénol

4VG : 4-vinylguaiacol

4VC : 4-vinylcatéchol

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Profil de croissance « général » des levures non-Saccharomyces (A), Saccharomyces (B), des bactéries lactiques <i>Oenococcus oeni</i> (C) pendant la vinification.	10
Figure 2 : Profil d'évolution des populations selon les méthodes de dénombrement (d'après Serpaggi, 2011).....	18
Figure 3 : Représentation des voies d'assimilation du carbone et de l'azote chez <i>B. bruxellensis</i> en conditions aérobies et anaérobies (Smith et Divol, 2016).....	22
Figure 4: Métabolisme respiro-fermentaire en présence de fortes concentrations de sucres et en présence d'oxygène, chez les levures Crabtree positives (Modifié sur le modèle de Hagman et Piskur, 2015).....	24
Figure 5 : Distribution des flux de carbone en conditions limitantes en oxygène (substrat non limitant) chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	25
Figure 6 : Distribution des flux de carbone chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i> en conditions limitantes en oxygène et en substrat.	26
Figure 7 : Effet Custer : effet d'un shift de l'aérobiose vers l'anaérobiose sur la cinétique de croissance de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (Steensels et al., 2015).	27
Figure 8 : Représentation schématique des génomes des souches AWRI 1499, AWRI 1608 et CBS 2499 de <i>B. bruxellensis</i> (Borneman et al., 2014).	32
Figure 9 : Formation des phénols volatils par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (Adapté de Steensels et al., 2015).	42
Figure 10 : Positions des 8 châteaux dans les différentes appellations du vignoble bordelais.	54
Figure 11 : Campagnes de prélèvements réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge en fermentation malolactique.....	57
Figure 12 : Campagnes de prélèvement réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge lors du 1 ^{er} été d'élevage.....	58
Figure 13 : Protocole de dénombrement par dilution sérielle et dépôt en goutte sur milieu gélosé.....	60
Figure 14: Protocole de traitement des échantillons de vin prélevés pendant la vinification.	62
Figure 15 : Principe de la PCR TYPEBRETT.....	65

Figure 16 : Nanofermenteur (cuve de spectrophotométrie de 4mL).....	69
Figure 17 : Protocole pour le phénotypage en « nanofermenteur ».....	70
Figure 18 : Protocole d'inoculation et d'aliquotage des cultures pour les essais température.....	77
Figure 19 : Exemple de suivi et d'analyse pendant l'expérience T°C pour une souche pour le suivi mensuel A.....	78
Figure 20 : Profil de croissance microbienne et d'évolution de la vitesse de croissance spécifique μ au cours du temps dans une culture discontinue.....	79
Figure 21 : Approximation de la biomasse produite par unité de temps par la méthode des trapèzes.....	80
Figure 22 : Origine des isolats du vin de la collection.....	91
Figure 23 : Nombre d'individus isolés sur des millésimes anciens (antérieurs à 1990) et génotypés par outil microsatellite.....	91
Figure 24 : Répartition des isolats de vin, dans les pays et dans les différentes régions de France échantillonnés.....	92
Figure 25 : Dendogramme représentant 1488 isolats de <i>B. bruxellensis</i> génotypés à l'aide des 12 marqueurs microsatellite (Avramova et al., soumis, Annexe 3).....	94
Figure 26 : Analyse en composante principale (ACP) des distances génétiques entre les 1318 individus de <i>B. bruxellensis</i> isolés du vin et génotypés à l'aide de 12 marqueurs microsatellites.....	96
Figure 27 : Distribution des groupes génétiques dans différents pays et régions.....	98
Figure 28 : Diversité génétique des isolats de <i>B. bruxellensis</i> du vignoble bordelais.....	99
Figure 29 : Distribution des groupes génétiques au cours des millésimes.....	101
Figure 30 : Distribution des individus dans les groupes de clones en fonction des groupes génétiques.....	103
Figure 31 : Identification des groupes de clones présents sur plusieurs millésimes dans 9 châteaux.....	104
Figure 32 : Distribution des distances (km) entre chaque paire d'individus génétiquement identiques isolés dans des échantillons de vins.....	106
Figure 33 : Présence de certains groupes de clone du groupe CBS2499-like diploïde (à gauche) et AWRI1499-like triploïde (à droite) dans différents pays.....	107
Figure 34 : Taux de migration relatifs pour chaque groupe génétique à l'échelle du globe.....	108

Figure 35: Présence de certains groupes de clone du groupe CBS2499-like diploïde (à gauche) et AWRI1499-like triploïde (à droite) dans des châteaux du vignoble bordelais.	110
Figure 36: Taux de migration relatifs pour les groupes génétiques présents dans le vignoble bordelais.	112
Figure 37: Spanning tree représentant les liens entre les souches du château G.	113
Figure 38: Distribution des individus isolés dans trois lots de vin en élevage au cours de millésime 2013.	114
Figure 39 : Distribution des isolats dans les génotypes identifiés dans le lot X de vin en élevage au mois d'Octobre, Novembre et Décembre 2014.	115
Figure 40 : Caractéristiques des 46 souches phénotypées en « nanofermenteur ». En a : position des groupes génétiques ; en b : origine écologique.	122
Figure 41: Exemples de profils de croissance : souches L14195 et VP1545 en présence de glucose sur milieu minimum en « nanofermenteur ».	125
Figure 42 : Distribution des vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{max}) de 46 souches de <i>B. bruxellensis</i> en fonction du substrat carboné.	127
Figure 43 : Résultats* du phénotype sur les plaques PM1 et PM2 Biolog de l'oxydation de mono-, di, tri- et polysaccharides ainsi que d'hétérosides par différentes souches de <i>B. bruxellensis</i>	130
Figure 44 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose.	133
Figure 45 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-galactose.	136
Figure 46 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de tréhalose.	137
Figure 47 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de cellobiose.	139
Figure 48 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires par les souches L0424 et L0469 en présence de glucose et de fructose.	142
Figure 49 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de glucose et de tréhalose.	145
Figure 50 : Matrice d'origine (à gauche) et groupe génétique d'appartenance (à droite) des 33 souches étudiées pour leur capacité de production de phénols volatils.	149

Figure 51 : Profils type de croissance de souches de <i>B. bruxellensis</i> en milieu défini pour la production de phénols volatils.	150
Figure 52 : Concentrations de 4-éthylphénol et de 4-vinylphénol produites par 33 souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> après 60 jours de culture.	152
Figure 53 : Concentrations de 4-vinylphénol (en haut) et de 4-éthylphénol (en bas) présentes à 10 jours et 60 jours de culture.	154
Figure 54 : Quantités de 4-éthylphénol et de 4-éthylguaïacol produites à J10, rapporté à l'intégrale de la population entre J0 et J10.	156
Figure 55 : Cinétique de croissance, production en phénols volatils et consommation en sources carbonées par CBS2499, AWRI1608 et AWRI1499 en milieu modèle.	158
Figure 56 : Profils de croissance et de production d'éthyl phénols des souches CBS2499, L0424 et AWRI1608 en présence de glucose et de tréhalose, en milieu synthétique défini.	163
Figure 57 : Effets de l'aération et de la présence d'alcool sur la production de 4-éthylphénol chez CBS2499, L0424 (triploïde, AWRI1499-like) et AWRI1608.	164
Figure 58 : Effet de l'aération et de l'éthanol sur la croissance de la souche <i>B. bruxellensis</i> L0424 en présence de fructose.	166
Figure 59 : Effet de l'aération et de l'éthanol sur les rendements de production en 4EP de la souche <i>B. bruxellensis</i> L0424.	167
Figure 60 : Campagnes de prélèvements réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge en fermentation.	174
Figure 61 : Distribution des quantités « disparues » de chaque sucre dans les lots entre la fin de la FA et la fin de la FML.	178
Figure 62 : Concentrations en glucose+fructose (à gauche) et en tréhalose (à droite) en mg/L, avant et après la FML dans les 14 lots de vins rouges.	178
Figure 63 : Contribution (en pourcentage) du glucose+ fructose ou du tréhalose à la diminution de la concentration totale de sucres pendant la FML.	179
Figure 64 : à gauche : distribution des quantités « libérées » de chaque sucre dans les lots entre les échantillons prélevés en fin FA et en FML ; à droite : concentrations en rhamnose (mg/L), avant et après la FML dans les 14 lots de vins rouges.	180
Figure 65 : Variabilité des échantillons de vin en fonction des concentrations de chaque sucre.	181

Figure 66: Distribution des concentrations en sucres en fonction du millésime d'origine de l'échantillon.	183
Figure 67: Concentrations en mannitol dans les échantillons de Cabernet-Sauvignon et de Merlot.....	184
Figure 68: Concentrations en tréhalose, en L-arabinose et en sorbitol dans des échantillons de vin rouge en fin FA et en fin FML.....	185
Figure 69: Campagnes de prélèvement réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge lors du 1er été d'élevage.	186
Figure 70: Concentrations moyennes des sucres résiduels présents dans les échantillons en fin de FML et en élevage.....	189
Figure 71: Distribution des concentrations en D-glucose-D-fructose, L-arabinose et tréhalose en fonction du château et du stade de prélèvement de l'échantillon.....	190
Figure 72: Distribution des concentrations en sucres en fonction du château d'origine de l'échantillon.	192
Figure 73: Distribution des concentrations en sucres en fonction du millésime de l'échantillon.	193
Figure 74 : Variabilité des échantillons de vin en élevage en fonction des concentrations de chaque sucre.....	194
Figure 75: Distribution des quantités « libérées » de chaque sucre dans les lots entre S0 et S1.	196
Figure 76: Distribution des quantités « disparues » de chaque sucre dans les lots entre S0 et S1.	197
Figure 77 : Variations de la concentration en phénols volatils en fonction de la durée entre les soutirages S0 et S1 et de la population initiale (S0) de <i>B. bruxellensis</i>	199
Figure 78: Concentrations en phénols volatils et sucres consommables par <i>B. bruxellensis</i> en S0 et en S1 dans les barriques.	200
Figure 79 : Variations des températures dans les chais A; D et F.	209
Figure 80 : Evolution de la population de la souche L0424 en cell/mL et en UFC/mL et de la souche L0611, inoculées à 10 ² UFC/mL, à 12, 14, 16, 18 et 20°C sur trois mois.	211
Figure 81 : Concentrations moyennes de phénols volatils à 1, 2 et 3 mois, à 12, 14, 16, 18 et 20°C, par la souche L0424 à gauche et par la souche L0611, à droite.....	213

Figure 82 : Evolution de la population totale (cell/mL) et cultivable (UFC/mL) de L0424 à 14°C et 18°C, pendant trois mois en fonction du taux d'inoculation de 10 ¹ , 10 ² et 10 ³ UFC/mL.	216
Figure 83 : Evolution de la population totale (cell/mL) et cultivable (UFC/mL) de L0611 à 14°C et 18°C, pendant trois mois en fonction du taux d'inoculation de 10 ¹ , 10 ² et 10 ³ UFC/mL.	217
Figure 84 : Populations cultivables (traits pleins) et phénols volatils produits (traits pointillés) pour chaque réplica (1 : gris foncé ; 2 : gris clair) de la souche L0611 pour les cultures incubées à 14°C (A) et à 18°C (B) et inoculées à 10 ³ UFC/mL.	218
Figure 85 : Quantité de phénols volatils produits dans des cultures inoculées par L0424 à 10, 10 ² et 10 ³ UFC/mL après trois mois d'incubation à 14°C (Bleu) et 18°C (Orange).	219
Figure 86 : Populations cultivables (traits pleins) et phénols volatils produits (traits pointillés) de la souche L0611 pour les cultures incubées à 14°C et à 18°C et inoculées à 10, 10 ² et 10 ³ UFC/mL.	220
Figure 87 : Evolution de la population en cell/mL (rouge) et UFC/mL (bleu) ainsi que de la concentration en phénols volatils (vert) à 14°C et 18°C sur 12 semaines pour la souche L0424 et pour la souche L0611.	221
Figure 88 : Représentation de la population cultivable (A et B), des concentrations en 4EP et en 4EG (A et B), des concentrations en glucose, fructose et tréhalose (C et D) de la souche L0424 à 14°C et 18°C.	222
Figure 89 : Profils de croissance de 8 souches de <i>B. bruxellensis</i> dans les vins A et B.	225
Figure 90 : Profil de production des phénols volatils de 8 souches de <i>B. bruxellensis</i> dans les vins A et B.	226
Figure 91 : Rendements de production en phénols volatils des souches de <i>B. bruxellensis</i> dans le vin A.	229

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Table des oses et polyols (Pellerin et Cabanis, 1998) (en g/L).....	14
Tableau 2: Caractéristiques des cinétiques de croissance de la souche CBS 2499 de l'espèce <i>Brettanomyces bruxellensis</i> dans un milieu minimum contenant 20g/l de glucose, en fonction de la disponibilité en oxygène. D'après Rozpedowska et al., 2011 et Galafassi et al., 2011.	27
Tableau 3 : Informations sur les métabolismes et les substrats associés aux sources carbonées consommées par <i>Brettanomyces bruxellensis</i> dans la littérature.	29
Tableau 4 : Souches de l'espèce <i>B. bruxellensis</i> dont le génome est séquencé.....	31
Tableau 5 : Limites de perception (LP) du 4EP et du 4EG dans l'H ₂ O, en solution hydroalcoolique et dans un vin rouge (Chatonnet, 1992).....	41
Tableau 6 : Souches phénotypées sur microplaques PM1 et PM2 (Biolog).....	74
Tableau 7 : Souches caractérisées pour leurs capacités de croissance et de production dans le vin.....	76
Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des vins A et B.	76
Tableau 9 : Modalités de suivi des cultures en fonction de la température et du taux d'inoculation.....	78
Tableau 10: Sucres dosés dans le vin par GC-FID	82
Tableau 11 : Conditions d'analyse pour le dosage des sucres résiduels dans les vins rouges par GC-FID.	84
Tableau 12 : Temps de rétention des sucres analysés par GC-FID dans le vin.....	84
Tableau 13 : Conditions d'extraction et d'analyse pour le dosage des phénols volatils par SPME-GC-MS.....	86
Tableau 14 : Temps de rétention et ions de référence des 5 molécules analysées par SPME-GC-MS.....	86
Tableau 15: Répartition des 1318 isolats du vin et de leurs génotypes dans les clusters identifiés par analyse des microsatellites.....	95
Tableau 16: Informations relatives aux isolats collectés dans les châteaux du vignoble bordelais et génotypés.	100
Tableau 17 : Groupe génétique et millésime correspondant au 1er isolement d'individus de notre collection dans le vin.....	102

Tableau 18: Distribution des géotypes « isolés » (représentés par un individu) et des groupes de clone dans les groupes génétiques.....	103
Tableau 19 : Résumé des profils d'utilisation de substrat carbonés après phénotypage de 46 souches de <i>B. bruxellensis</i>	124
Tableau 20 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur monosaccharides en conditions aérobies.	134
Tableau 21 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur disaccharides en conditions aérobies.....	140
Tableau 22 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur mélange de glucose et de monosaccharides en conditions aérobies.....	143
Tableau 23 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur mélange de glucose et de disaccharides en conditions aérobies.	146
Tableau 24 : Bilan des cultures de <i>B. bruxellensis</i> CBS2499 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats). ...	161
Tableau 25 : Bilan des cultures de <i>B. bruxellensis</i> L0424 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats). ...	161
Tableau 26 : Bilan des cultures de <i>B. bruxellensis</i> AWRI1608 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats). ...	162
Tableau 27: Concentrations en sucres résiduels (GC-FID) à fin FA et fin FML dans des lots de vin rouge en mg/L.....	176
Tableau 28 : Concentrations en sucres résiduels (en mg/L) dans des vins en élevage, après le 1er (S0) et avant le second soutirage d'été (S1).....	187
Tableau 29 : Effets des facteurs château, millésime et stade et de leur combinaison sur la concentration des sucres dans des échantillons de vin en élevage	191
Tableau 30: Bilan des températures relevées par les capteurs dans les chais sur la période été, dans 3 châteaux.....	210
Tableau 31 : Populations à T0 dans les cultures déterminées par qPCR (en cellules/mL) et par dénombrement sur boîte (en UFC/mL) et inoculées à 10 ² UFC/mL	211
Tableau 32 : Moyennes des populations initiales et finales pour la souche L0424.....	212
Tableau 33 : Populations initiales (T0) totales (cell/mL) et cultivables (UFC/mL).....	215
Tableau 34 : Paramètres de production et de croissance à 14°C et 18°C pour la souche L0424.	222
Tableau 35 : Quantité consommée en sucres fermentescibles à 18°C.....	223

Tableau 36 : Profil des sucres résiduels des vins A et B.....	226
Tableau 37 : Quantités de sucres consommés par des souches* de <i>B. bruxellensis</i> pendant 6 semaines de culture dans le vin A (mg/L).	227
Tableau 38 : Quantités de sucres consommés par des souches* de <i>B. bruxellensis</i> pendant 6 semaines de culture dans le vin B (mg/L).	227

Introduction générale

Le vin est l'une des plus anciennes boissons fermentées produites et consommées par l'Homme. Les plus anciennes traces associées au raisin, matière première du vin, ont été retrouvées en Géorgie et datent de 8000 ans av. J.-C. (Mc Govern, 2017). Cette boisson millénaire résulte de transformations microbiennes qui contribuent aussi à sa conservation ainsi qu'à son équilibre et à sa richesse aromatique. Néanmoins, certaines espèces microbiennes interfèrent dans ce processus d'élaboration et altèrent significativement les qualités organoleptiques du vin. Parmi elles, *Brettanomyces bruxellensis* (*B. bruxellensis*) est probablement la plus redoutée par les vinificateurs.

Cette levure est la principale responsable de la conversion en phénols volatils des acides hydroxycinnamiques naturellement présents dans les vins. Lorsque les phénols volatils sont présents en quantités supérieures au seuil de perception olfactive, on parle alors de vins « phénolés ». Ces déviations aromatiques rappelant le cuir, l'écurie ou le clou de girofle sont responsables du masquage de l'arôme fruité des vins et constituent l'un des principaux défauts des vins rouges. Cette diminution de la qualité aromatique est perçue par les professionnels entraînés, mais également par les consommateurs et constitue un critère de rejet des vins bien établi.

Le développement et l'universalisation des outils de séquençage haut débit ont récemment permis d'accéder aux informations génétiques par l'obtention des séquences génomiques complètes. Le séquençage du génome de plusieurs individus a montré une variabilité intraspécifique importante, notamment due à des niveaux de ploïdie variables au sein de l'espèce (Curtin *et al.*, 2012 ; Borneman *et al.*, 2014). La diversité génétique des souches de *B. bruxellensis* serait supérieure à celle observée chez *Saccharomyces cerevisiae*, en termes de nombre de chromosomes et de niveau de ploïdie. L'association de ces travaux de séquençage à d'autres outils de biologie moléculaire permet désormais de différencier rapidement un nombre important de souches par analyse de leur empreinte génétique, notamment par des méthodes basées sur la recherche des variations de séquence et du nombre de copies alléliques (Albertin *et al.*, 2014).

Après une synthèse bibliographique, le premier chapitre de cette thèse sera consacré à l'étude de la diversité génétique et de la dissémination des individus de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* isolés du vin. Pour cela, un nombre important d'individus (1318) ont été collectés en grande partie au cours de cette thèse et de la thèse de Marta Avramova (2017, ISVV). Ces individus sont issus de vins produits dans des zones viti-vinicoles situées sur plusieurs continents (Afrique du Sud, Australie, Brésil, Europe, États-Unis d'Amérique) et dans plusieurs régions pour certains pays (France et Italie). Une grande partie des souches étudiées proviennent notamment de la région bordelaise, grâce à une collaboration étroite avec des propriétés. Des vins de différents

millésimes et stades de vinification ont ainsi pu servir de matrices d'isolement. La caractérisation génotypique des individus a ensuite été réalisée en utilisant des outils microsatellite. L'analyse des profils alléliques obtenus nous a permis d'étudier les dispersions des individus, en lien avec leur niveau de ploïdie, aux échelles mondiales et régionales. La dissémination des groupes génétiques à l'échelle temporelle sera également discutée. Une étude de cas à l'échelle d'un château nous permettra d'apprécier la diversité de la population en présence à l'échelle du chai et dans un vin.

D'autre part, de nombreux travaux se sont intéressés aux capacités de croissance et de production de l'espèce *B. bruxellensis* grâce aux outils de microbiologie classique. Ils ont notamment mis en évidence une variabilité intraspécifique importante en termes de capacité de production, d'implantation et de développement dans le vin et en milieu modèle. Néanmoins, l'origine de cette diversité phénotypique reste mal comprise. Pourtant, faire le lien entre les données génétiques et les comportements observés permettrait de mieux déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation surprenante de certaines souches. Le second chapitre portera sur l'étude du lien entre le regroupement génétique des individus et leurs caractéristiques phénotypiques. Plus précisément, les profils de consommation en sources carbonées des souches ont été étudiés par le biais de deux méthodes. Les capacités de production de phénols volatils ont également été étudiées. Des analyses cinétiques et métaboliques plus poussées nous ont permis d'obtenir une première image de la variabilité entre les souches quant à leur capacité de croissance en fonction des substrats et conditions d'oxygénation du milieu.

Les capacités de survie et de développement de cette espèce jusqu'à des populations supérieures à 10^5 cellules par millilitre de vin dans les conditions physico-chimiques strictes du vin (pH bas, hautes concentrations en éthanol, milieu pauvre en sources carbonées et azotées) en font un ennemi redoutable et nécessitent un contrôle assidu tout au long de la vinification. Le développement de méthodes efficaces pour lutter contre ces levures est donc un enjeu œnologique majeur, en région bordelaise comme à l'échelle mondiale. Outre les méthodes physiques et chimiques d'élimination, la connaissance des facteurs favorisant ou limitant son développement dans le vin pourrait permettre un meilleur diagnostic des situations à risque et leur prévention. Les sucres, présents en quantités de l'ordre du mg/L, constituent des substrats de croissance potentiels pour les microorganismes du vin et notamment *B. bruxellensis*. Pour avancer sur ce point, dans le troisième chapitre, nous présenterons une actualisation des connaissances sur les profils et les concentrations de sucres résiduels majoritaires des vins rouges de Bordeaux. Pour cela, un nombre important d'échantillons de vins rouges ont été collectés à différents stades de vinification dans des châteaux du vignoble bordelais. Dans un second temps,

le lien entre les profils obtenus, leur évolution et l'altération des vins par *B. bruxellensis* pendant le 1^{er} été d'élevage en barrique sera discuté.

Au vu de la fréquence à laquelle les vins sont contaminés lors de cette période du 1^{er} été d'élevage en barrique, nous avons étudié l'effet du facteur température sur le développement de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin, dans des gammes de température retrouvées au chai. Les résultats et discussions associées seront présentés dans le quatrième chapitre. Enfin, les capacités de croissance, de consommation des sucres et d'altération des vins rouges de souches appartenant aux principaux groupes génétiques retrouvés dans les vins seront mesurées et discutées.

Revue bibliographique

1 Processus de vinification des vins rouges

Du raisin au vin, les opérations de vinification sont nombreuses et ont chacune un rôle important dans l'élaboration du vin. Nous allons ici présenter les principales opérations réalisées et leurs rôles dans l'élaboration d'un vin rouge. Les itinéraires techniques peuvent bien entendu varier d'une propriété à l'autre, en fonction des spécificités que le vinificateur souhaite donner à son produit. Les généralités décrites ci-après sont en partie issues du Traité d'œnologie 6^{ème} édition (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012).

1.1 Les étapes pré-fermentaires

Le raisin, une fois arrivé à la maturité désirée, est récolté lors de la **vendange**. De manière générale, les baies de raisin sont ensuite séparées de la rafle, lors de l'**égrappage**. Puis ces baies sont écrasées de façon à rompre la pellicule pour dégager la pulpe et le jus lors de l'opération de **fouillage**. Lors du transfert du raisin vers la cuve, le moût de raisin peut être **sulfité** par addition d'anhydride sulfureux (SO₂), entre 3 et 8 g/hL. Celui-ci est ici principalement utilisé pour ses activités anti-oxydantes pour préserver la couleur et les arômes fruités. Il favorise également la lyse des cellules du raisin et la libération de leur contenu. Après ces opérations pré-fermentaires, la vendange est **mise en cuve** où les opérations de **fermentations**, nécessaires à l'élaboration du vin, vont avoir lieu. En amont de la fermentation alcoolique (FA), une étape de macération pré-fermentaire (MPF) à basse température (entre 5 et 15°C sur 4 à 10 jours) peut être réalisée. A la différence de l'extraction alcoolique des composés pendant la FA ou la **macération post-fermentaire**, la MPF repose sur l'extraction aqueuse des arômes et composés polyphénoliques de la baie (Cai *et al.*, 2014). La finalité de l'opération est donc d'enrichir la couleur et les arômes du vin (Parenti *et al.*, 2004 ; Heredia *et al.*, 2007), les résultats étant néanmoins variables selon les conditions (température, durée, cépage et millésime) appliquées (Álvarez *et al.*, 2006 ; de Beer *et al.*, 2006 ; Ortega-Heras *et al.*, 2012 ; Cai *et al.*, 2014).

1.2 La fermentation alcoolique

Le premier processus microbiologique important durant la vinification est la fermentation alcoolique (FA). Les **sucres** (glucose et fructose) contenus dans la vacuole des cellules de la pulpe du raisin sont convertis en **éthanol** et en **dioxyde de carbone** par **les levures**. Cette étape peut durer de 4 à 21 jours. Elle s'accompagne de la **macération** des parties solides (pellicules, pépins, éventuellement rafles s'il n'y a pas eu égrappage) qui accentue la dissolution des composés phénoliques et des tanins responsables de la couleur des vins rouges.

De nombreuses levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* sont présentes sur la baie de raisin et dans les moûts (Mortimer et Polsinelli, 1999 ; Renouf *et al.*, 2007b ; Zott *et al.*, 2008). Durant les premières heures, les levures non-*Saccharomyces* prédominent, mais, rapidement, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) devient majoritaire (Wine Microbiology, 2ème ed., Fulgelsang et Edwards). Dans le moût riche en sucres, *S. cerevisiae* est capable de fermenter les sucres en éthanol en dépit de la présence d'oxygène (Thomson *et al.*, 2005). Cette capacité, l'effet Crabtree (p23), associée à une résistance aux hautes concentrations en éthanol, lui permet d'occuper rapidement l'espace écologique. Les levures *S. cerevisiae* produisent, par ailleurs, de nombreux métabolites secondaires (glycérol, acide succinique, alcools supérieurs, acides gras, esters) d'intérêt œnologique, car ils influencent significativement les caractéristiques organoleptiques du vin (Ribéreau-Gayon, 1971, Romano *et al.*, 2003). Lorsque la quasi-totalité des sucres réducteurs du moût a été transformée en alcool, la fermentation s'arrête et la population de levures chute (Wine Microbiology, 2ème ed., Fulgelsang et Edwards).

Certains paramètres sont régulés afin de limiter tout risque d'altération et/ou d'éviter un arrêt prématuré de la fermentation et d'assurer une bonne extraction des composés phénoliques :

- La **température** doit être maintenue aux alentours de 25 à 28°C, un risque d'arrêt prématuré existant pour des températures supérieures à 30°C.
- **L'aération des moûts** par les opérations de remontage ou de pigeage est également primordiale (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1951). L'oxygène fourni stimule la fermentation par les levures et leur permet de mieux résister à une température élevée. Elle permet également une homogénéisation de la température, des sucres et des levures, facilite l'extraction des constituants du marc (constitués des parties solides) et évite la réduction du SO₂ en H₂S.

Une pratique régulièrement rencontrée dans les chais est le **levurage**, c'est-à-dire, l'inoculation de levures actives dans le moût dès la mise en cuve. Ce processus est réalisé par l'ajout de moût en fermentation ou de Levures Sèches Actives (LSA) commerciales. L'établissement rapide d'une population élevée de *S. cerevisiae* active a pour principaux objectifs de monopoliser l'écosystème microbien, tout en débutant rapidement la transformation des sucres en éthanol. Cela permet de limiter le développement des microorganismes indigènes potentiellement moins bénéfiques, voire néfastes à la qualité finale du vin. Afin de faciliter la macération et la libération des composés du raisin, il est également possible d'ajouter des préparations enzymatiques industrielles (**enzymage**).

À la suite de la fermentation alcoolique et de la macération, on procède à l'**écoulage**. Le **marc** (ensemble des parties solides du raisin) et le moût sont séparés. Le moût est le **vin de goutte**

et le marc, après pressurage, donne le **vin de presse**. Celui-ci, riche en tanins et en pigments pourra être assemblé pendant l'élevage au vin de goutte ou élevé à part.

1.3 La fermentation malolactique

Les deux vins, de goutte et de presse vont, séparément ou pas, être l'objet d'une seconde fermentation, appelée **fermentation malolactique (FML)** en cuve ou en barrique. Elle est réalisée par les bactéries lactiques et principalement par l'espèce *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) (Davis *et al.*, 1985 ; Dicks *et al.*, 1995). Le principal phénomène observé est la transformation de l'acide-L-malique (un diacide) en acide-L-lactique (un monoacide) (Lonvaud-Funel, 1999 ; Davis *et al.*, 1986). Cette décarboxylation entraîne une désacidification du vin, ce qui permet une amélioration importante sur le plan gustatif : l'acide-L-malique peut conférer une verdeur acide indésirable au vin ; l'acide lactique est plus doux et moins agressif sur les papilles de la langue (de Revel, 1999). Le développement d'*O. oeni* réduit la concentration de substrats disponibles pour d'autres espèces et conduit donc également à une stabilisation microbiologique du vin. Néanmoins, cette étape est difficile à contrôler du fait de la variation de la composition des vins en fin de FA d'un millésime à l'autre et d'une cuve à l'autre : pH, éthanol et sulfites, mais aussi température sont les paramètres physico-chimiques ayant le plus d'impact sur la croissance d'*O. oeni*. Des retards de fermentation peuvent être observés et le développement précoce de microorganismes indésirables (levures, bactéries) associé à la formation de composés altérant les caractéristiques du vin est alors possible. Dans un souci d'amélioration du procédé et de limitation du temps, certains vignobles procèdent à une inoculation de leur moût avec des levains commerciaux constitués de souches d'*O. oeni* sélectionnées.

Dès la disparition complète de l'acide malique, le vin est sulfité. En plus des propriétés précédemment évoquées, c'est ici l'activité anti-microbienne du SO₂ qui est recherchée, afin de limiter les développements microbiens, toujours indésirables pendant l'élevage.

1.4 L'assemblage

Dans un vignoble, l'emplacement d'une parcelle, le sol et le cépage sont des facteurs déterminants de la qualité et des caractéristiques chimiques du raisin. En fonction des qualités organoleptiques recherchées, le vinificateur peut choisir de réaliser la FA et/ou la FML par parcelle, par cépage ou bien d'assembler avant fermentation certains lots de raisin. Les lots peuvent être assemblés après la FA, mais la majorité sont assemblés après la FML et avant l'élevage en barrique, suite aux dégustations de chaque lot. Certains vinificateurs choisissent d'attendre la fin de l'élevage pour assembler.

1.5 L'élevage

À la sortie des fermentations, le vin rouge est encore trouble et gazeux. Son élaboration nécessite une phase d'élevage, généralement réalisée en barrique, parfois en cuve, et au cours de laquelle le vin repose pendant plusieurs mois. Cette période est d'une durée variable selon l'origine, la nature et la qualité du vin recherchées et peut se poursuivre pendant 2 ans pour le vieillissement des grands vins.

L'élevage des vins rouges en barrique permet aux arômes, à la couleur et aux saveurs du vin d'évoluer sous l'influence des phénomènes d'**oxydoréduction**. Il apporte de la **structure au vin** grâce à la diffusion des tannins du bois des barriques. L'élevage permet également la **clarification** du vin grâce à la sédimentation des particules plus denses et notamment des microorganismes. En effet, dans le vin au repos, les levures sédimentent, ce qui engendre un gradient de concentrations dans la barrique. En conséquence, les **lies**, dépôts que l'on trouve au fond des barriques contenant notamment des débris végétaux, des cristaux d'hydrogènotartrate de potassium, se chargent progressivement en levures. Renouf (2006b) rapporte que la population en levures totales peut atteindre plus de 10^4 UFC/mL au fond de la barrique, tandis que la population au sommet est inférieure à 1 UFC/mL. Le **soutirage** consiste à séparer le vin clair de ces dépôts situés au fond du contenant d'élevage et sur les parois. Le vin est ensuite remplacé dans un nouveau contenant propre, préalablement sulfité, afin de réajuster la teneur en SO_2 libre. Cette opération, réalisée régulièrement au cours de l'élevage, permet de clarifier le vin, de le dégazer par élimination du CO_2 et de réajuster les teneurs en SO_2 libre. Le retrait des lies associé à cette opération permet également d'éliminer une partie conséquente de la population levurienne, effet renforcé par le réajustement du SO_2 libre (Renouf, 2006b). Puis, entre deux soutirages, les populations de levure peuvent augmenter. Les soutirages réguliers permettent donc de maintenir les populations microbiennes à des niveaux acceptables. De manière générale, les recommandations indiquent que des soutirages réguliers, tous les 2 à 3 mois permettent un contrôle et un maintien des populations à des niveaux jugés acceptables.

Pour l'élevage en barrique, certains privilégient l'utilisation de **barriques neuves**, qui apportent un maximum de boisé, d'autres celle de **barriques usagées** « un vin » (ayant déjà été utilisées une fois, généralement lors du millésime précédent). Les barriques neuves seraient plus favorables au maintien ou au développement des levures et des bactéries acétiques que les barriques usagées, du fait d'apports plus importants en oxygène et en sucres (Renouf, 2006b).

Dans la barrique, le volume occupé diminue de par les phénomènes d'évaporation, d'absorption et de « contraction » des vins. Il est important de maintenir les barriques pleines, afin d'éviter notamment les phénomènes d'oxydation. Pour cela, des apports réguliers de vin ou

« ouillage » sont réalisés. Un soin très important doit être apporté à la conservation des vins d'ouillage, afin d'éviter l'apport de flore de contamination dans les vins en cours de stabilisation.

1.6 Le collage et la mise en bouteille

Après l'élevage, le vin est soumis à une opération de **collage** pour ses effets clarifiants et stabilisants. Il s'agit de l'ajout d'une substance « capable de s'y coaguler et de donner des flocons ; la formation des flocons et leur sédimentation entraînent les particules du trouble » (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977). Les microorganismes assimilables à des particules colloïdales, peuvent être éliminés, en partie, par ce biais-là (Gerbaux *et al.*, 1997 ; Renouf, 2006b). Le vin peut également subir des opérations de filtration en conditions stériles puis le conditionnement en bouteille doit respecter un cahier des charges très strict pour éviter les contaminations et le développement de microorganismes dans les bouteilles. Un résumé des développements microbiens souhaités au cours de la vinification est présenté sur la Figure 1.

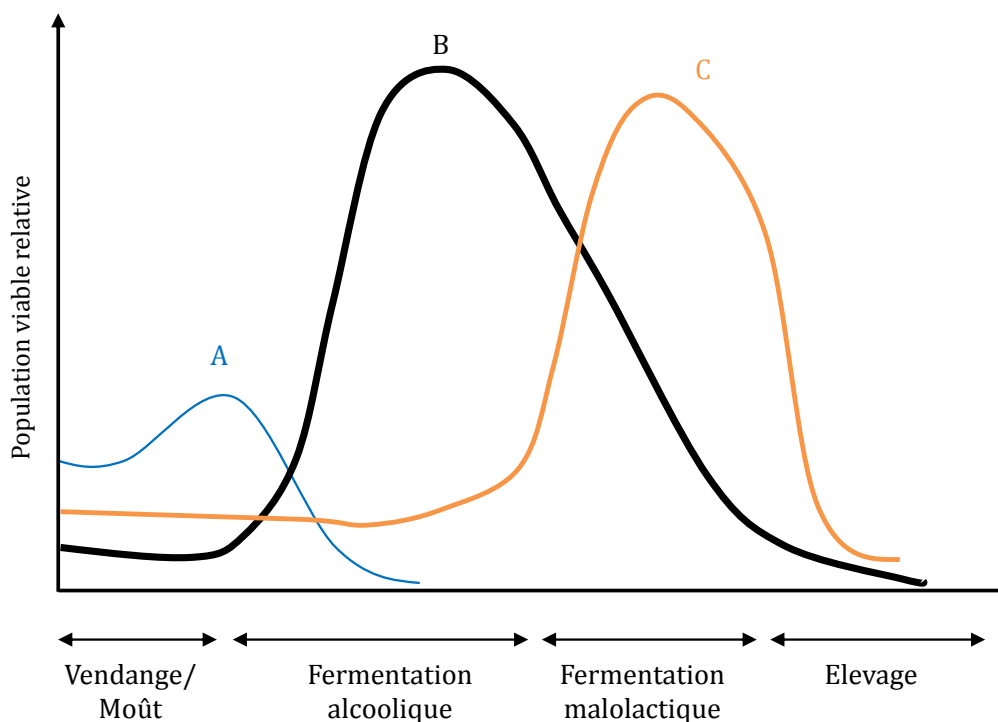


Figure 1: Profil de croissance « général » des levures non-*Saccharomyces* (A), *Saccharomyces* (B), des bactéries lactiques *Oenococcus oeni* (C) pendant la vinification.

Tout au long du processus de vinification, des développements de flores indésirables (levures, bactéries lactiques, bactéries acétiques) peuvent survenir. Un microorganisme est indésirable s'il entraîne la formation de composés indésirables ou s'il ne se développe pas au moment opportun. D'après Wine Microbiology, 2^{ème} éd., Fulgelsang et Edwards.

1.7 Évolution de la composition glucidique du vin au cours de son élaboration

Le développement des microorganismes dans le vin repose sur la présence des nutriments nécessaires. Parmi ceux-ci, les substances glucidiques, essentielles, sont hautement diverses et leurs concentrations évoluent tout au long de l'élaboration du vin. La/les composition(s) en sucres simples et complexes dans les vins rouges aux différentes étapes de vinification seront donc déterminées pendant cette thèse. Cela permettra d'apporter des éléments de réponse quant à leur influence sur l'altération des vins par *B. bruxellensis* ainsi que de mettre à jour les connaissances dans ce domaine.

1.7.1 Le raisin et le moût

Les glucides, produits de la photosynthèse de la feuille de vigne, migrent à travers le phloème vers le raisin et sont accumulés, principalement à partir de la véraison, sous la forme de **glucose**, **fructose** et d'un peu de **saccharose** dans la vacuole des cellules de la pulpe (Lavee et Nir, 1986 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 6^{ème} ed. Traité Œnologie). Lorsque le raisin est à maturité, le rapport Glucose/Fructose est de 0,9 à 1. En début de fermentation alcoolique, 150 à 250g/L de glucose et fructose sont présents dans les moûts. À ce stade, on retrouve également des pentoses, tels que le **xylose**, le **rhamnose**, l'**arabinose** et le **ribose** (Conde *et al.*, 2015). Certains polyols, comme le **mannitol** et le **sorbitol**, sont également retrouvés dans les cellules de la pulpe du raisin, où ils s'accumulent en cas de stress hydrique (Conde *et al.*, 2015). La présence de sorbitol dans les vins est également en partie associée à l'état de la vendange. Il n'avait en effet pas été retrouvé dans les raisins sains, mais il avait été identifié dans des raisins pourris à des teneurs d'environ 25mg/L de jus de raisin (Triquet-Pissard, 1979). Le raisin contient également de nombreux polysaccharides comme la **cellulose**, les **arabinogalactanes** et les **pectines**, polymère d'acides galacturoniques et de divers oses (rhamnose, galactose, arabinose et xylose) des parois cellulaires (Pellerin et Cabanis, 1998). Les polymères pectiques et les hémicelluloses (arabinogalactanes) sont libérés dans les moûts lors du foulage des baies. Leurs concentrations sont d'autant plus importantes qu'il y a macération des pulpes et que la maturité du raisin est avancée. Les celluloses sont peu libérées (Pellerin et Cabanis, 1998).

1.7.2 La fermentation alcoolique

Glucose et fructose sont catabolisés en éthanol par les levures et en fin de fermentation alcoolique, leurs concentrations sont de l'ordre du gramme voire de quelques centaines de milligramme par litre. Il reste généralement plus de fructose que de glucose, le second étant consommé de manière préférentielle par les levures. La fermentation alcoolique chez les levures

s'accompagne de la production de glycérol, 3^{ème} constituant du vin après l'alcool et l'eau, à des teneurs entre 5 et 10g/l. Celles-ci peuvent également produire des quantités de l'ordre de 20 à 60mg/L de sorbitol au cours de la FA (Triquet-Pissard, 1979).

En fin de FA, le phénomène d'apoptose des levures est associé à leur autolyse. L'autolyse correspond à l'autodégradation enzymatique des constituants cellulaires qui commence immédiatement après la mort des levures (Charpentier et Feuillat, 1993). Elle est précédée d'une phase d'activation (désorganisation des endostructures cellulaires). Alors qu'elle est de quelques heures dans des conditions optimales (pH 4,5-5, 35-40°C), dans les vins, la phase d'activation est de quelques semaines voire de 2 à 3 mois compte tenu de la faible valeur du pH (3-3,5), et de la basse température de conservation (< ou = à 15°C) (Pellerin et Cabanis, 1998). Ces phénomènes permettent la libération des **glucanes** (essentiellement des polymères de (1,3)- β -D-Glucose) et des **mannoprotéines** qui constituent la paroi cellulaire, ainsi que du **tréhalose**, accumulé dans les cellules (Bertrand *et al.*, 1975). Lors de leur autolyse, les levures *S. cerevisiae* libèrent aussi des enzymes β -glucosidases qui peuvent hydrolyser de nombreux hétérosides issus du raisin (Darriet *et al.*, 1988). Leur dégradation permet notamment la libération de **glucose**, **galactose**, **xylose**, **rhamnose** et **arabinose** dans le vin (Harborne *et al.*, 1975).

Parallèlement, les enzymes pectinolytiques du raisin, libérées dans le moût et éventuellement par les préparations enzymatiques (pectinases, glucanases) ajoutées au cours du processus de vinification endommagent les polysaccharides du raisin. Ainsi, en fin de FA, il ne reste plus de pectines, mais seulement des oligomères d'acide galacturonique et des rhamnogalacturonanes. Les arabinogalactanes sont peu affectés. Les concentrations en oligosaccharides et en résidus glycosylés dans les vins sont de l'ordre de quelques milligrammes par litre et varient en fonction du cépage (Apolinar-Valiente *et al.*, 2014 et 2015) et du domaine viticole (Apolinar-Valiente *et al.*, 2013).

1.7.3 La fermentation malolactique

Aucune étude n'a clairement été menée au sujet de l'évolution de la composition glucidique du vin pendant la FML. En milieu modèle, plus de 90% des souches d'*O. oeni* peuvent dégrader le **glucose**, le **tréhalose** et le **ribose**. La consommation du fructose, galactose, mannose, arabinose, xylose, saccharose, lactose, maltose et mélibiose est souche-dépendante (Hocine *et al.*, 2010 ; Cibrario *et al.*, 2016). Ainsi, en fonction des souches commerciales ou indigènes en présence, la composition en sucres résiduels en fin de FML va varier et peut, en fonction des sucres présents, favoriser le développement de *B. bruxellensis*. D'autre part, certaines souches d'*O. oeni* et de *B. bruxellensis* présentent une activité β -glucosidase notamment contre les β -D-glucopyranoside suggérant une capacité à utiliser des sources autres que les mono-, di- et

trisaccharides résiduels du vin. *O. oeni* peut également produire du **mannitol** à partir de la consommation du fructose (Garvie, 1986). *O. oeni* peut également dégrader les polysaccharides présents dans les vins et libérer des exopolysaccharides composés de glucose, galactose et rhamnose (Dols-Lafargue *et al.*, 2007, Dimopoulou *et al.*, 2012 et 2014).

1.7.4 L'élevage en barrique

L'élevage en barrique est le siège de modifications importantes dans la composition du vin et notamment de celle en sucres (Del Alamo *et al.*, 2000). En effet, les concentrations en sucres résiduels de la fermentation peuvent évoluer du fait de la diffusion des mono, oligo et polysaccharides du bois, de la dégradation des hétérosides et de la consommation des oses et oligosides par les microorganismes présents (Harborne *et al.*, 1975). Del Alamo (2000) a notamment montré que les teneurs en **arabinose**, **galactose** et parfois **rhamnose** peuvent augmenter pendant l'élevage en barrique et leurs variations dépendent de l'origine géographique du bois de chêne et du tonnelier.

Le bois de chêne du genre *Quercus* est le plus largement utilisé pour la fabrication des barriques utilisées pour l'élevage du vin. Il est composé de trois polymères :

- La cellulose (50%), polymère linéaire de monomère de D-glucose
- Les hémicelluloses (20%), assemblage de polysaccharides dérivés du glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose, acides glucuronique et galacturonique
- La lignine (30%), polymère réticulé de phenylpropane

Parmi les composés non volatils du bois, on retrouve également des monosaccharides et des polyols (Alanon *et al.*, 2009). Parmi eux, le **fructose**, **glucose** et **galactose** sont majoritaires. On retrouve des quantités moins importantes de **xylose**, **arabinose**, **érythritol**, **arabitol** et **mannitol** (Alanon *et al.*, 2009). Les quantités varient de manière importante selon l'espèce associée au genre *Quercus* et peuvent être modifiées lors de la chauffe des barriques et des copeaux (Alanon *et al.*, 2010). Ce processus est essentiel à la production de composés importants pour le développement des arômes du vin (Singleton, 1995). Il conduit entre autres à la dégradation des polymères et notamment des hémicelluloses et de la lignine, moins structurées que la cellulose. Il diminue également de manière importante les quantités en monosaccharides et en polyols retrouvées dans le bois (Alanon *et al.*, 2010). Le vin pénètre dans les souches internes de la barrique (jusqu'à 8mm), permettant aux microorganismes qui y sont présents de coloniser le bois (Barata *et al.*, 2013). Ces sucres présents dans le bois pourraient permettre leur croissance. Les monosaccharides du bois diffusent également dans le vin au cours de l'élevage. Il en est de même pour le **cellobiose**, disaccharide libéré lors de la chauffe du bois des barriques (Blondin *et*

al., 1982). Outre les sucres décrits précédemment, des diholosides réducteurs tels que le **mélibiose**, le **lactose** et le **maltose** (Pellerin et Cabanis, 1998) ont également été observés dans le vin.

Le tableau 1 résume les concentrations moyennes en oses, dérivés d'oses (polyols) et disaccharides identifiés dans les moûts, les vins rouges et les vins blancs. Néanmoins, nous ne disposons pas d'étude cinétique de l'évolution de la composition en mono-, di- et trisaccharides dans le vin lors des étapes clés de son élaboration. Or, les sucres résiduels présents en fin de FA et pendant l'élevage sont une source d'énergie pour les bactéries et les levures notamment pour les espèces d'altération. Une étude globale sur l'évolution des concentrations pendant les fermentations et l'élevage apporterait donc des informations importantes pour la compréhension des mécanismes de vieillissement du vin et les sucres préférentiellement impliqués dans le développement des microorganismes, aux stades tardifs de vinification (FML et élevage).

Tableau 1: Table des oses et polyols (Pellerin et Cabanis, 1998) (en g/L).

ND : non déterminé.

	Moûts			Vins Rouges			Vins Blancs		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
D-glucose	70	125	95	0,01	0,95	0,15	0,09	0,5	0,17
D-fructose	70	125	95	0,01	0,83	0,25	0,04	0,78	0,34
L-arabinose	0,01	0,3	0,08	0,01	0,3	0,08	0,08	0,25	0,06
D-galactose	-	-	-	ND	0,13	-	-	-	-
D-xylose	ND	0,15	0,04	ND	0,15	0,04	ND	0,12	0,03
Tréhalose	-	-	0,02	0,03	0,65	0,3	0,02	0,5	0,25
Saccharose	0,5	15	1,5	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	3	14	5,9	0,5	15	6,2
2,3 Butanediol	-	-	-	0,35	1,5	0,72	0,42	1,25	0,65
Mésoinositol	0,32	0,75	0,4	0,11	0,69	0,37	0,18	0,68	0,4
Mannitol	0,03	0,1	0,06	0,09	0,53	0,21	0,08	0,39	0,18
Erythritol	-	-	-	0,06	0,14	0,09	0,03	0,11	0,07
Arabitol	-	-	-	0,02	0,2	0,08	0,04	0,14	0,05
Xylitol	-	-	-	0,01	0,12	0,04	0,01	0,06	0,02
Ribitol	-	-	-	ND	0,08	0,02	ND	0,05	0,01
Sorbitol	-	-	0,01	0,07	0,19	0,12	0,03	0,11	0,07

2 *Brettanomyces bruxellensis* : généralités et physiologie

2.1 Les origines

Les premières souches de levures du genre *Brettanomyces* ont été isolées à partir d'échantillons de fermentation tardive d'English Stock Beer, en 1904 par Claussen. Il montra que la bière entrainait en seconde fermentation après inoculation de cette levure. Claussen choisit le nom *Brettanomyces*, en référence à la connexion étroite entre l'industrie anglaise de bière (Brettano) et les levures (myces). Ce n'est qu'en 1921 que le genre *Brettanomyces* fut défini (Kufferath et Van Laer), suite à l'isolement de nouvelles souches. En 1940, apparaît la première mention de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* (Custer, 1940). Cette espèce est retrouvée dans de nombreux produits fermentés à travers le monde : le vin, la bière, le kombucha (thé fermenté, Teoh *et al.*, 2004, Coton *et al.*, 2017), le bioéthanol (Passoth, 2007 ; Galafassi, 2011), le cidre (Morrissey, 2004, Coton *et al.*, 2006), le kéfir ou le levain de panification (Meroth *et al.*, 2003).

Le rôle de *B. bruxellensis* dans les procédés de fabrication des produits fermentés est ambigu. Caractérisée par une croissance lente, elle est particulièrement adaptée aux environnements pauvres en nutriments, présentant des pH faibles et des concentrations en éthanol élevées. Dans le vin, elle est associée à la production de défauts organoleptiques et est considérée comme une cause d'altération majeure des vins dans le monde entier (voir partie D). Au contraire, sa présence est recherchée pour la production d'arômes complexes dans la fermentation de bières de spécialité belges et américaines telles que les gueuzes et les bières lambiques (Verachtert *et al.*, 1992 ; Bokulich *et al.*, 2012 ; Steensels *et al.*, 2015). Originellement considéré comme un organisme indésirable dans les fermentations de bioéthanol de par sa capacité à entrer en compétition avec *S. cerevisiae*, de récents travaux ont amené à reconsidérer son potentiel (Passoth *et al.*, 2007 ; Reis *et al.*, 2014). Les pertes économiques comme le potentiel industriel de cette espèce ont conduit les chercheurs à étudier ses caractéristiques, son métabolisme et les facteurs influençant son développement.

2.2 Taxonomie et morphologie

Depuis 1940, la classification des espèces du genre *Brettanomyces* a considérablement évolué. A ce jour, cinq espèces sont reconnues comme appartenant au genre *Brettanomyces* : *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomala* et *B. bruxellensis* (Smith *et al.*, 1998a et 1998b). Les noms *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces intermedia*, *Brettanomyces schanderlii*, *Brettanomyces claussenii* et *Mycotorula intermedia* sont reconnus comme des synonymes de *B. bruxellensis* (Barnett *et al.*, 1990).

Les individus du genre *Brettanomyces* sont **anamorphes**. En 1960, l'observation de la production d'ascospores (forme sporulante) par van der Walt et van der Kerken a conduit à la définition du genre téléomorphe *Dekkera* dans la classification, pour les espèces *B. bruxellensis* et *B. anomala* en 1964 par van der Walt. Du fait des difficultés techniques d'induction de la sporulation et de la différenciation des deux états, cet état téléomorphe n'a, à notre connaissance, pas été observé depuis. Certains auteurs ont montré que, dans le contexte du vin, la séparation des deux genres n'avait pas de sens, car les techniques d'identification ADN ne permettent pas leur distinction (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006). De manière générale, ces deux espèces sont souvent référées en tant que « *Brettanomyces/Dekkera* » (van der Walt, 1964 ; Curtin et Pretorius, 2014). Dans un souci de simplification, le terme générique *Brettanomyces* sera utilisé dans la suite de ce manuscrit.

Par ailleurs, *B. bruxellensis* est **petite positive** c'est-à-dire qu'elle est capable de générer des mutants dépourvus d'ADN mitochondrial (Hellborg et Piškur, 2009).

Enfin, d'un point de vue morphologique, ces cellules se multiplient par bourgeonnement multipolaire (van der Walt, 1970). Bien que plus petites que *Saccharomyces*, elles sont facilement visibles au microscope optique. Il n'est néanmoins pas possible d'identifier l'espèce par ce biais-là, du fait d'un polymorphisme important. En effet, les cellules végétatives ont une forme ogivale qui résulte des cicatrices laissées par les nombreux bourgeonnements multipolaires, mais des formes sphériques, ellipsoïdales ou cylindriques ont également été observées (Shung-Chang *et al.*, 1985). On peut les trouver sous forme de cellules isolées, en paire sous forme de chaînette ou de pseudo-mycéliums non septés (Smith et Grinsven, 1984 ; Shung-Chang *et al.*, 1985). En outre, la taille et la morphologie varient en fonction des conditions de culture, de la phase de croissance (Peynaud et Domerg, 1956 ; Dickinson, 1996 ; Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000 ; Vigentini *et al.*, 2013) et de stress environnementaux (acide acétique : Capusoni *et al.*, 2016 ; Oxygène : Louw *et al.*, 2016).

2.3 Besoins nutritionnels et tolérance aux facteurs abiotiques

2.3.1 Tolérance aux facteurs abiotiques et état VNC

À l'instar de *S. cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* est particulièrement bien adaptée aux milieux fermentaires et bien que leurs lignées aient divergé il y a 200 millions d'années, les deux espèces partagent un certain nombre de caractéristiques physiologiques (Rozpedowska *et al.*, 2011). Toutes deux présentent une résistance importante à l'**éthanol** ainsi qu'au **stress osmotique**. Les souches de *B. bruxellensis* les plus sensibles croissent jusqu'à 13,5% (v/v) d'éthanol, les plus résistantes étant inhibées à 15,5% (v/v) dans un milieu synthétique et dans le

vin (Conterno *et al.*, 2006 ; Barata *et al.*, 2008a). Le taux de croissance et le rendement en biomasse peuvent néanmoins être fortement diminués par la présence d'éthanol (Medawar *et al.*, 2003).

Résistantes à l'**acidité** et aux **pH bas** (la majorité des souches étudiées par Conterno *et al.* (2006) présentent une croissance à pH 2), elles sont également capables de se développer dans des **milieux limitants en oxygène**. La combinaison de tous ces facteurs chez une espèce est rare (Piškur *et al.*, 2006 ; Rozpedowska *et al.*, 2011) et fournit un avantage crucial à ces deux espèces pour leur développement dans les environnements fermentaires. Néanmoins, à la différence de *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* est connue pour ses très faibles exigences nutritionnelles (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000).

La **température** optimale de croissance de *B. bruxellensis* se situe entre 25°C et 28°C (Fugelsang et Edwards, 2007), mais elle survit à basse température (Conterno *et al.*, 2006 ; Zuehlke et Edwards 2013).

B. bruxellensis est également capable de présenter une tolérance importante au **SO₂**, antiseptique couramment utilisé en œnologie (Curtin *et al.*, 2012b ; Longin *et al.*, 2016a). Les stress provoqués par l'ajout de sulfite ou par l'oxydation du milieu semblent entraîner un **état « Viable, mais Non Cultivable » (VNC)** chez certaines souches de *B. bruxellensis* (du Toit *et al.*, 2005 ; Agnolucci *et al.*, 2010 ; Serpaggi *et al.*, 2012 ; Willenburg et Divol, 2012 ; Longin *et al.*, 2016a). Capozzi *et al.* (2016) ont montré que l'entrée en état VNC (perte de cultivabilité) est fonction de la souche utilisée combiné à la concentration en SO₂ dans le milieu (Serpaggi *et al.*, 2012 ; Capozzi *et al.*, 2016 ; Longin *et al.*, 2016a).

Dans l'état « Viable, mais Non Cultivable », les cellules, conservent une activité métabolique et une intégrité membranaire, mais sont dans l'incapacité de se multiplier et donc de former des colonies sur les milieux gélosés qui permettent habituellement leur dénombrement (test de cultivabilité) (Yamamoto, 2000). Cet état physiologique permettrait aux microorganismes de résister aux conditions environnementales difficiles (Oliver, 1993 et Oliver *et al.*, 1995). Cet état serait réversible et les cellules pourraient de nouveau se multiplier, lorsque le milieu leur redevient favorable (Whitesides et Oliver, 1997). Bien qu'elles ne soient pas détectables sur milieu gélosé, les populations VNC sont quantifiables en qPCR, en épifluorescence et en cytométrie en flux. Serpaggi (2011) décrit les caractéristiques d'une population entrant en état VNC suite à un stress de la manière suivante :

- La population cultivable chute jusqu'à devenir indétectable par les méthodes de culture traditionnelles.

- La population viable se stabilise révélant donc une faible mortalité.
- La population totale (cellules mortes + cellules viables) reste stable au cours du temps (Figure 2).

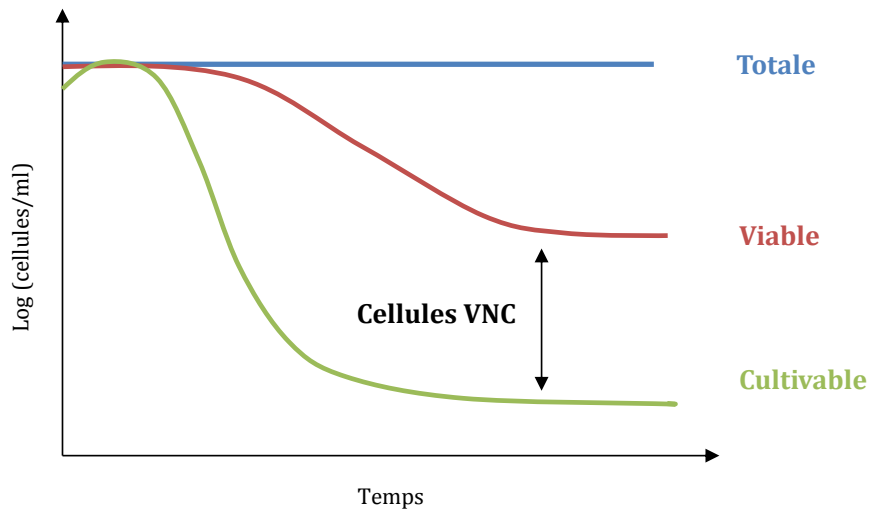


Figure 2 : Profil d'évolution des populations selon les méthodes de dénombrement (d'après Serpaggi, 2011)

Pour certains auteurs (Nyström, 2003 ; Ramamurthy *et al.*, 2014), la reprise de la cultivabilité ne serait due qu'à la croissance de quelques cellules résiduelles présentant un métabolisme normal dans une population majoritairement non cultivable. Néanmoins, Salma *et al.* (*S. cerevisiae* ; 2013) puis Capozzi *et al.* (*B. bruxellensis* ; 2016) ont montré que la reprise de cultivabilité serait due à une véritable sortie des cellules de l'état VNC. Une première étude transcriptomique a révélé que l'entrée en état VNC chez *B. bruxellensis* semblait liée à la toxicité des sulfites et à la réponse au stress oxydatif généré (Capozzi *et al.*, 2016). La répression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN lorsque l'état VNC est induit comparativement à la situation où le SO₂ est éliminé du milieu est en faveur d'une véritable ressuscitation des cellules (Capozzi *et al.*, 2016).

2.3.2 Assimilation de l'azote

L'azote joue un rôle essentiel dans la cellule car il entre dans la constitution de molécules nécessaires à son fonctionnement (acides aminés, nucléotides, vitamines et coenzymes) et peut être utilisé par les levures sous plusieurs formes (organique ou inorganique).

Chez *B. bruxellensis*, l'**ammonium**, le **glutamate** et la **glutamine** sont des sources préférentiellement utilisées en **azote** et l'**urée**, la **proline** et le **nitrate** sont des sources secondaires (de Barros Pita *et al.*, 2013b) comme c'est également le cas chez *S. cerevisiae*

(Magasanik et Kaiser, 2002; Boer *et al.*, 2007). Les autres acides-L-aminés, les dipeptides, l'urée et les intermédiaires du métabolisme de l'arginine et de la proline peuvent également être utilisés par *B. bruxellensis* comme sources d'azote (Conterno *et al.*, 2006 ; de Barros Pita *et al.*, 2013a et b ; Crauwels *et al.*, 2015 ; Cajueiro *et al.*, 2017). Certaines souches utilisent le nitrate comme unique source d'azote (Conterno *et al.*, 2006 ; Crauwels *et al.*, 2014 et 2015), contrairement à *S. cerevisiae* (de Barros Pita *et al.*, 2011). Celui-ci est réduit en nitrite par l'action d'une nitrate réductase puis en ammonium par la nitrite réductase (Siverio *et al.*, 2002).

La disponibilité en sources d'azote a un effet sur la croissance de *B. bruxellensis*. Des conditions limitantes en azote (7,5 mM d'azote/L) diminuent les capacités de croissance, de consommation en sucres et de production en éthanol (de Barros Pita *et al.*, 2013b). L'utilisation de sources « secondaires » entraîne une diminution des vitesses et des quantités de biomasses produites (De Barros Pita *et al.*, 2013b). Aguilar-Uscanga (2000) montre, par ailleurs, que des concentrations excédant 2g/L de sulfate d'ammonium inhibent la croissance de la levure.

2.3.3 Assimilation du phosphore

Le **phosphore** est également un élément essentiel qui intervient dans la biosynthèse de l'ADN, l'ARN, l'ATP, l'ADP, l'AMP, des lipides... (Castro-Martinez, 2007). Aguilar-Uscanga (2000) montre que *B. bruxellensis* n'est pas exigeante d'un point de vue nutritionnel et notamment en phosphate. Une concentration de 34mg de phosphate/g d'extrait de levure semble suffire à ses besoins.

2.3.4 Vitamines et oligoéléments

En ce qui concerne les vitamines, les travaux de Peynaud et Domercq (1956) ont montré que les levures du genre *Brettanomyces* sont auxo-autotrophes. En effet, ils indiquent que l'« *on note toujours une croissance en l'absence complète de vitamines et on peut repiquer indéfiniment ces levures en milieu minéral sans vitamines* » (Peynaud et Domercq, 1956). Cependant, dans ces conditions, la multiplication est très réduite. L'adjonction individuelle des vitamines stimule la croissance et la fermentation. L'action de la thiamine et de la biotine sont les plus importantes. En milieu carencé en thiamine, la population levurienne finale est très faible (10% de la population normale) et la transformation des sucres est extrêmement lente. L'absence de biotine retarde beaucoup plus la fermentation de sucre que la croissance, contrairement à ce qui se passe chez *Saccharomyces*. Les vitamines généralement retrouvées après fermentation dans les vins sont la biotine, la choline, l'inositol et la thiamine à des concentrations allant de 1µg/L à 730 mg/L (Kunkee et Eschnauer, 2003).

Les oligo-éléments sont des éléments essentiels à l'activité cellulaire car certains sont des cofacteurs de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme. Nécessaires en très faibles quantités, ils deviennent toxiques lorsqu'ils sont en excès et provoquent la dénaturation d'enzymes, une perturbation de la morphologie, de la physiologie cellulaire et de la vitesse de croissance (Blackwell *et al.*, 1995 ; Castro-Martinez, 2007). Comme pour le phosphate, les besoins de *B. bruxellensis* en oligo-éléments sont faibles (Gaunt *et al.*, 1988) et 0,7mg de magnésium /g d'extrait de levure suffisent à sa croissance (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2000).

2.3.5 Les sources carbonées

L'une des clés qui pourrait contribuer à favoriser le développement rapide de *B. bruxellensis* dans de nombreux vins, est sa capacité à utiliser de nombreux substrats carbonés comme substrats de croissance.

D'après la littérature, *B. bruxellensis* est capable de fermenter et d'assimiler de nombreux substrats carbonés. Parmi les **hexoses**, la majorité des souches étudiées consomme le glucose, le fructose, le mannose, alors que l'assimilation du galactose est souche-dépendante (Conterno *et al.*, 2006 ; Leite *et al.*, 2013 ; Crauwels *et al.*, 2015). À la différence de *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* peut assimiler des **pentoses** tels que le ribose et l'arabinose (Crauwels *et al.*, 2015), l'utilisation de ce dernier étant variable selon la souche (Conterno *et al.*, 2006). Certaines souches ont également la capacité d'utiliser certains **polyols** (adonitol, glycérol et mannitol), ainsi que des **acides organiques** (acétate, lactate, malate, succinate et citrate) comme unique source de carbone pour leur croissance (Conterno *et al.*, 2006). L'acide tartrique n'est pas utilisé par cette espèce. En fonction des souches, l'**éthanol** peut être utilisé comme seule source de carbone par métabolisme respiratoire (Dias *et al.*, 2003a ; Conterno *et al.*, 2006). Il n'est néanmoins pas consommé en conditions limitantes en oxygène (Vigentini *et al.*, 2008, Smith et Divol, 2016). Le **glycérol** et l'**acide acétique** ne peuvent être utilisés eux aussi qu'en présence d'oxygène (Smith et Divol, 2016).

Un des avantages compétitifs de *B. bruxellensis* par rapport à *S. cerevisiae* est sa capacité à dégrader et à fermenter des **osides**. Toutes les souches de *B. bruxellensis* phénotypées dans la littérature sont capables d'utiliser dégrader et d'utiliser le **tréhalose** (disaccharide de glucose, liés par une liaison α , α -1,1). Certaines souches peuvent dégrader le maltose, le lactose ou le **cellobiose** (Blondin *et al.*, 1982 ; Conterno *et al.*, 2006 ; Blomqvist *et al.*, 2010 ; Crauwels *et al.*, 2015 ; Steensels *et al.*, 2015).

Enfin, certaines souches peuvent métaboliser des sucres plus complexes tels que l'**amidon** (Galafassi *et al.*, 2011) et les **pectines** (Crauwels *et al.*, 2015), ou les **dextrines**, telles que le

maltotetraose et le maltopentaose, sucres résiduels présents en fin de fermentation de la bière (Kumara et Verachtert, 1991 ; Kumara *et al.*, 1993 ; Crauwels *et al.*, 2015 et 2017).

B. bruxellensis peut également métaboliser certains **acides aminés** tels que l'acide-L-glutamique et la L-méthionine, comme uniques sources de carbone (Crauwels *et al.*, 2015). Les résultats sur la proline sont contradictoires. Dans l'étude de Conterno en 2006, aucune souche ne montrait de croissance sur ce substrat. Crauwels, en 2015, montre que les 7 souches étudiées étaient capables d'oxyder et d'assimiler la proline.

2.4 Métabolisme des substrats carbonés et croissance de *B. bruxellensis*

2.4.1 Métabolismes respiratoire et fermentaire

Si plusieurs études ont permis de mettre en évidence une diversité et une variabilité d'utilisation en sources carbonées importantes (voir chapitre suivant), les voies métaboliques empruntées pour leur utilisation en fonction des conditions du milieu (disponibilité en oxygène et en substrat) sont peu connues. La [Figure 3](#) résume les principales connaissances actuelles sur les métabolismes carbonés et azotés chez *B. bruxellensis*. *Brettanomyces bruxellensis* est une levure **anaérobie facultative** c'est-à-dire capable de se développer en présence ou en absence d'oxygène (Rozpedowska *et al.*, 2011). De manière générale, les hexoses sont d'abord catabolisés par la voie de la **glycolyse**, ou d'Embden-Meyerhoff, et le produit final est le pyruvate. Par molécule d'hexose métabolisée (C6), deux molécules de **pyruvate** sont produites et seront catabolisées via les voies de la respiration et/ou de la fermentation. La production d'énergie sous forme d'ATP est couplée à la génération de cofacteurs réduits tels que le NADH et dépend donc principalement des conditions d'aération du milieu.

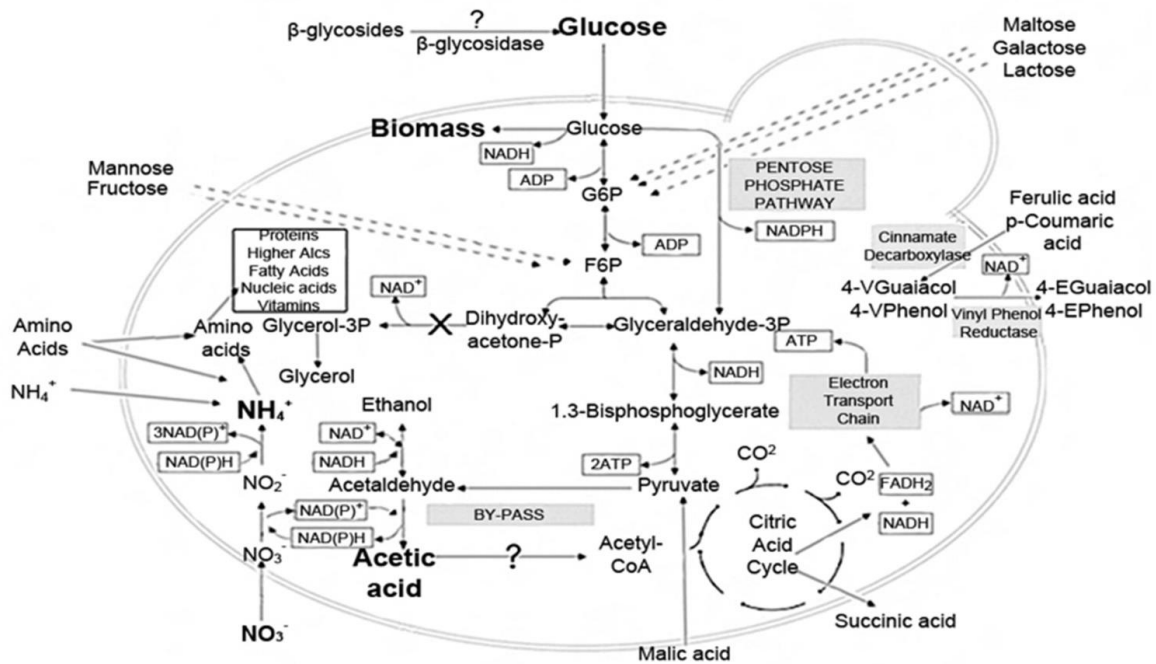
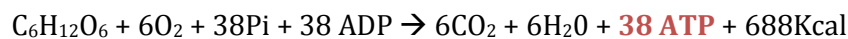


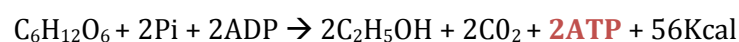
Figure 3 : Représentation des voies d'assimilation du carbone et de l'azote chez *B. bruxellensis* en conditions aérobies et anaérobies (Smith et Divol, 2016).

Les points d'interrogation représentent les voies qui peuvent être utilisées, mais de manière souche-dépendante. Le X sur la voie de formation du glycérol indique que seules certaines souches expriment les gènes permettant sa formation.

En présence d'oxygène, le pyruvate est transformé par la pyruvate déshydrogénase en acétyl-CoA. Celui-ci entre dans le **cycle de Krebs** qui se déroule dans la mitochondrie. Les cofacteurs réduits (NADH et FADH₂) produits lors de la glycolyse et du cycle de Krebs sont oxydés au niveau de la **chaîne respiratoire**. Cette « régénération » des cofacteurs s'accompagne de la formation d'**ATP**. En présence d'oxygène, indispensable à l'activation de la chaîne respiratoire, l'oxydation de l'hexose est complète et la production d'énergie maximale : c'est le **métabolisme respiratoire**.



Pour régénérer ses cofacteurs sans avoir recours à la chaîne respiratoire, la levure peut adopter un **métabolisme fermentaire**. Le pyruvate est décarboxylé par la pyruvate décarboxylase en **acétaldéhyde**. Celui-ci est ensuite réduit en **éthanol** avec oxydation du NADH. Le gain énergétique n'est que de 2ATP par hexose, mais il est suffisant pour la multiplication.



Néanmoins, du fait de la quantité plus importante en ATP formé en aérobiose, le rendement en biomasse ($Y_{x/s}$) est plus élevé en métabolisme respiratoire (0,50 g/g de glucose) qu'en métabolisme fermentaire (0,10 g/g de glucose). En métabolisme fermentaire, le rendement théorique en éthanol est de 0,51 g d'éthanol par gramme de glucose consommé. Néanmoins de nombreuses voies métaboliques secondaires, participant à la maintenance et à la multiplication cellulaire, s'ajoutent à ce métabolisme central. Elles limitent ce rendement à 80-90% de sa valeur théorique chez *B. bruxellensis* (Castro-Martinez, 2007).

2.4.2 Ecart à ces métabolismes « idéaux »

Au cours de son évolution, un organisme adapte son métabolisme aux conditions environnementales, i.e. la disponibilité en oxygène et en sources nutritionnelles et à leurs variations. Cela lui permet d'adopter la meilleure stratégie pour un développement optimal (en termes de croissance et de consommation en substrats).

2.4.2.1 *Effet Crabtree*

Dans des **environnements riches en sucres**, *B. bruxellensis* et *S. cerevisiae* fermentent les sucres en éthanol **en présence d'oxygène** alors que la respiration est possible (van Dijken et Scheffers, 1986 ; Rozpedowska *et al.*, 2011). Cette caractéristique nommée **l'effet Crabtree** est communément associée à la "stratégie" « faire-accumuler-consommer » (Thomson *et al.*, 2005 ; Rozpedowska *et al.*, 2011). Cette stratégie permet d'occuper l'espace écologique par une croissance et une consommation des substrats rapides au détriment de leurs compétiteurs, et la libération d'éthanol rend le milieu toxique pour la plupart des microorganismes (Piskur *et al.*, 2006). Puis, lorsque le milieu est déplété en glucose, *S. cerevisiae* et *B. bruxellensis* peuvent consommer l'éthanol par métabolisme respiratoire. L'effet Crabtree se manifeste chez *S. cerevisiae* à partir de 2g/L de glucose (Ribéreau-Gayon *et al.*, 6^{ème} ed. Traité Œnologie). Les réactions associées sont présentées sur la Figure 4.

L'apparition il y a 50 à 100 millions d'années (Ere du Crétacée) de milieux présentant de hautes concentrations en sucres fermentescibles (excès de fruits) aurait introduit une pression de sélection dont un résultat serait l'acquisition de cet avantage sélectif chez *B. bruxellensis* et *S. cerevisiae*. Il semble que les deux espèces aient utilisé, **de manière indépendante**, un mécanisme similaire de réarrangement à grande échelle des promoteurs (Ihmels *et al.*, 2005 ; Rozpedowska *et al.*, 2011).

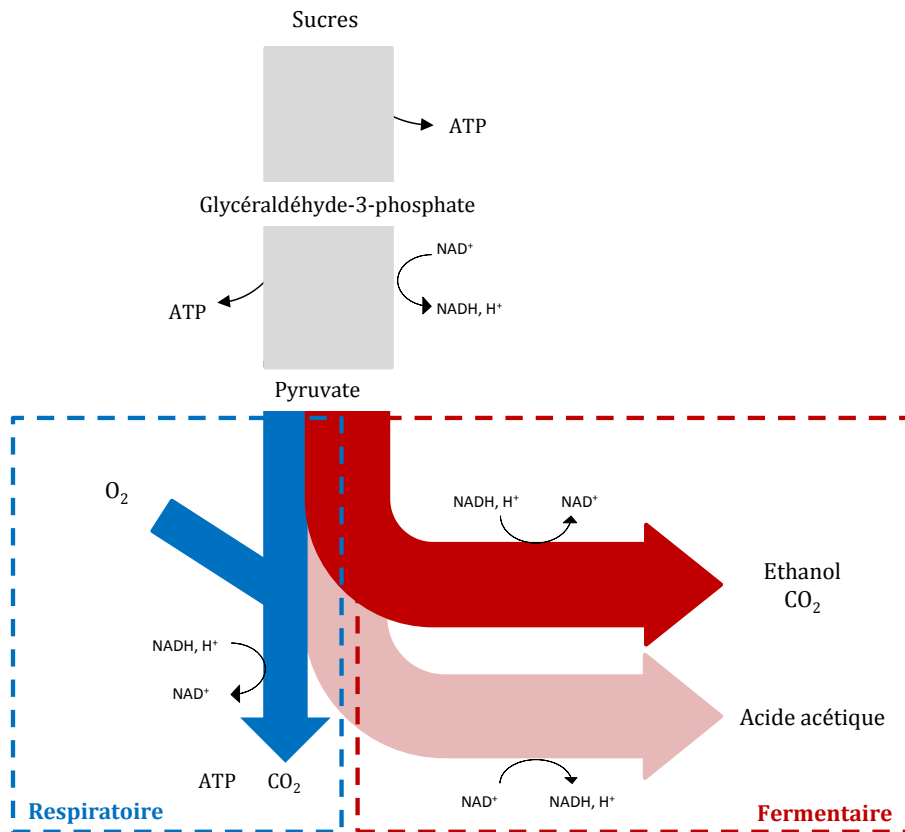


Figure 4: Métabolisme respiro-fermentaire en présence de fortes concentrations de sucres et en présence d'oxygène, chez les levures Crabtree positives (Modifié sur le modèle de Hagman et Piskur, 2015).

2.4.2.2 Synthèse d'acide acétique

Une seconde caractéristique de *Brettanomyces bruxellensis* est sa capacité à **produire de l'acide acétique** (Figure 4) lorsqu'elle adopte un métabolisme fermentaire **en présence d'oxygène** et en quantités supérieures à *S. cerevisiae* (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; Leite *et al.*, 2013). Cela lui permet notamment de diminuer le pH de son environnement local au détriment d'espèces environnantes moins résistantes à l'acidité. Lorsque la source carbonée est déplétée, elle pourra utiliser l'acide acétique via sa transformation en acétyl CoA qui entre ensuite dans le cycle de Krebs.

La production d'acide acétique permet, par ailleurs, de régénérer le NAD(P)H nécessaire à l'assimilation du nitrate (Siverio *et al.*, 2002, Galafassi *et al.*, 2013). Néanmoins, la production d'acide acétique n'est pas sans risque pour *B. bruxellensis*. Ses effets toxiques se traduisent notamment par le déclenchement de phénomènes apoptotiques, la modification du pH intracellulaire et de l'activité des enzymes de la voie glycolytique. Cela conduit à une diminution de la quantité de biomasse formée et de substrats consommés (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; Capusoni *et al.*, 2016). Le seuil de sensibilité à l'acide acétique est très variable selon les souches

et Capusoni *et al.* (2016) ont récemment démontré que des conditions limitantes en oxygène en plus de limiter la production d'acide acétique, favorisent la tolérance de *B. bruxellensis* à celui-ci.

2.4.2.3 Limitation en oxygène

> Conditions non limitantes en substrat

En conditions limitantes en oxygène, une partie du flux de carbone est redirigée vers la production d'éthanol et la vitesse, le rendement de croissance ainsi que la quantité d'acide acétique produit diminuent (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; Galafassi *et al.*, 2011 ; Capusoni *et al.*, 2016) (Figure 5). Les rendements en éthanol sont similaires voire supérieurs à ceux observés chez *S. cerevisiae* dans ces conditions mais variables selon les souches (Galafassi *et al.*, 2011 ; Blomqvist *et al.*, 2010, 2012, de Barros Pita *et al.*, 2013b). *B. bruxellensis* peut également produire de très faibles quantités de glycérol ce qui lui permet de régénérer une partie du pool de NADH (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; Galafassi *et al.*, 2011 ; Tiukova *et al.*, 2013).

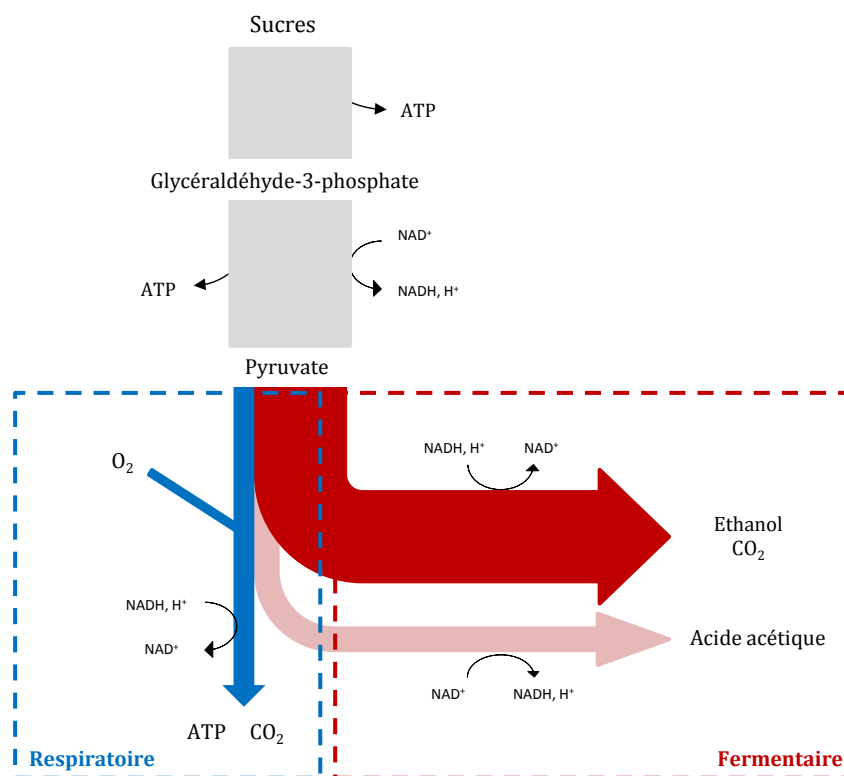


Figure 5 : Distribution des flux de carbone en conditions limitantes en oxygène (substrat non limitant) chez *Brettanomyces bruxellensis*.

> Conditions limitantes en substrat

Une des caractéristiques remarquables de *Brettanomyces bruxellensis* est sa capacité à se développer dans des milieux pauvres en carbone et en oxygène tels que le vin. Elle est bien plus adaptée à ce genre de milieu que *S. cerevisiae*. Dans ces conditions, son métabolisme devient **respiratoire**, la production de biomasse est privilégiée, et l'éthanol et l'acide acétique sont peu ou pas produits (Blomqvist *et al.*, 2012 ; Tiukova *et al.*, 2013) (Figure 6). Tiukova (2013) a récemment montré que, dans ces conditions limitantes, le **complexe NADH déshydrogénase** (complexe I) de la chaîne respiratoire, absent chez *S. cerevisiae*, était exprimé chez *B. bruxellensis* (Woolfit *et al.*, 2007 ; Prochazka *et al.*, 2010).

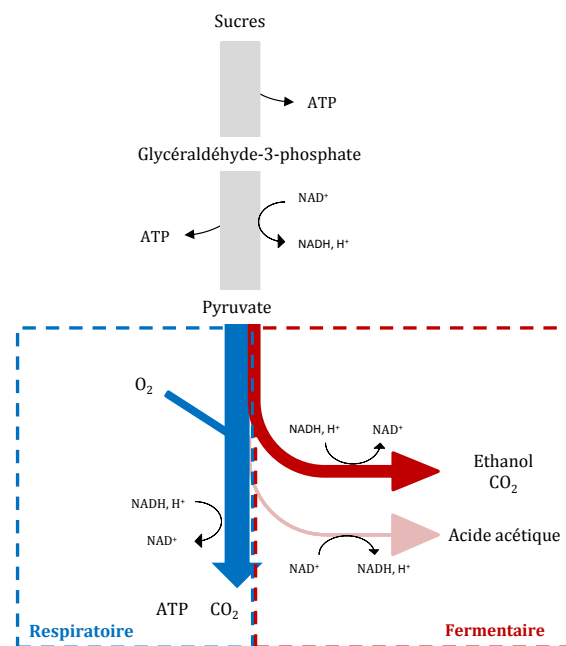


Figure 6 : Distribution des flux de carbone chez *Brettanomyces bruxellensis* en conditions limitantes en oxygène et en substrat.

2.4.2.4 Effet Custer

L'effet Custer décrit une inhibition de la fermentation au passage en condition anaérobie, suite à un déséquilibre dans la balance d'oxydation-réduction des cellules (Custer, 1940 ; Wikén *et al.*, 1961 ; Scheffers, 1961, 1966). En effet, lorsque l'oxygène disparaît du milieu, la chaîne respiratoire n'est plus active, *B. bruxellensis* n'est plus capable de réduire ses coenzymes et la glycolyse est bloquée (Wijsman *et al.*, 1984). A la différence de *S. cerevisiae*, capable de restaurer sa balance redox par la production de glycérol (Leite *et al.*, 2013), *B. bruxellensis* en produit peu (Rozpedowska *et al.*, 2011 ; Pereira *et al.*, 2014). Néanmoins, cette inhibition est transitoire (Blomqvist *et al.*, 2012) et la levure recommence à produire de l'éthanol sans produire de l'acide acétique (Steensels *et al.*, 2015). Dans ces conditions, l'activation de voies intracellulaires permettant la ré-oxydation du NADH telles que la réduction d'hydroxystyrènes en dérivés éthylés

ou l'ajout d'accepteur d'électrons tels que l'acétoïne permettent de lever ce blocage (Scheffers, 1966). La présence d'acides aminés dans le milieu permet également de limiter ce phénomène d'inhibition (Blomqvist *et al.*, 2012).

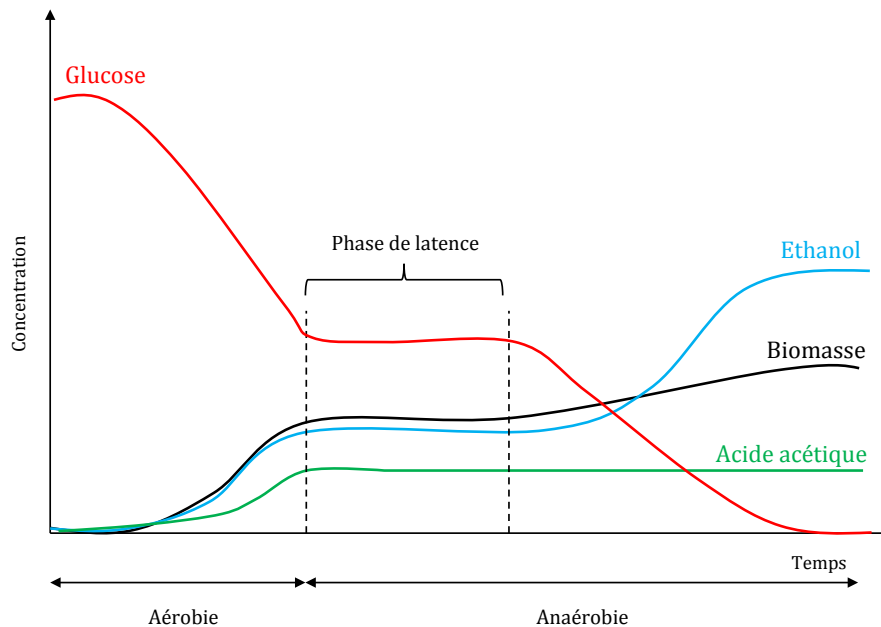


Figure 7 : Effet Custer : effet d'un shift de l'aérobiose vers l'anaérobiose sur la cinétique de croissance de *Brettanomyces bruxellensis* (Steensels *et al.*, 2015).

La phase de latence est due au blocage de la glycolyse provoqué par un déficit en NAD^+ . La réactivation des voies intracellulaires permettant la ré-oxydation du $NADH$ permet la levée de ce blocage et la production d'éthanol sans acide acétique.

Tableau 2: Caractéristiques des cinétiques de croissance de la souche CBS 2499 de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans un milieu minimum contenant 20g/l de glucose, en fonction de la disponibilité en oxygène. D'après Rozpedowska *et al.*, 2011 et Galafassi *et al.*, 2011.

Oxygène	Conditions non limitantes	Conditions limitantes	Anaérobie
Vitesse spécifique de croissance (h^{-1})	$0,120 \pm 0,0015$	$0,083 \pm 0,006$	$0,0725 \pm 0,0025$
Rendement (g/ g de glucose)			
Biomasse	$0,179 \pm 0,003$	$0,073 \pm 0,004$	$0,141 \pm 0,09$
Ethanol	$0,327 \pm 0,007$	$0,44 \pm 0,03$	$0,345 \pm 0,005$
Glycérol	0	$0,0078 \pm 0,0007$	0,007
Acide acétique	$0,059 \pm 0,001$	$0,0013 \pm 0,0002$	0
Vitesse (mmol/g de masse sèche/h)			
Glucose	$3,65 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,18$	$1,535 \pm 0,065$
Ethanol	$4,15 \pm 0,25$	$2,83 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,08$
Glycérol	0	$0,022 \pm 0,002$	0,02
Acide acétique	$0,66 \pm 0,04$	$0,025 \pm 0,002$	0

2.4.2.5 Autres substrats

Le taux de conversion des sucres en biomasse varie d'un sucre à l'autre (Blomqvist *et al.*, 2011 ; de Barros Pita *et al.*, 2011 et 2013a ; Leite *et al.*, 2013). Par ailleurs, pour des concentrations importantes en substrats carbonés, la souche GDB 248 présente des vitesses de croissance spécifiques (h^{-1}) variables selon les sucres qui par ordre décroissant donnent, en condition aérobie:

Saccharose > Glucose, Glucose + fructose > Cellobiose > Fructose > Maltose > Lactose

Pour cette même souche, la croissance est toujours plus rapide sur saccharose que sur glucose quel que soit le milieu considéré (de Barros Pita *et al.*, 2013a ; Leite *et al.*, 2013). La croissance est plus affectée par la limitation en oxygène en présence de maltose que de glucose, fructose ou saccharose (de Barros Pita, 2013a).

Chez *S. cerevisiae*, on observe la répression par certains sucres fermentescibles (glucose, fructose et mannose) du catabolisme d'autres sources carbonées, de la respiration et de la néoglucogénèse (Verstrepen *et al.*, 2004). Chez *B. bruxellensis*, Muktaduzzaman *et al.* (2015) ont récemment mis en évidence un effet similaire de répression catabolique par le glucose sur l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation du galactose, le cycle de Krebs, la structure des cytochromes, le cycle du glyoxylate et la néoglucogénèse. En présence de glucose et de fructose, la consommation du glucose débute toujours en premier, mais celle du fructose pourrait commencer avant que l'épuisement complet du glucose (Gilis, 1999 ; Barbin *et al.*, 2008).

Le tableau 3 résume les comportements métaboliques observés sur différents substrats potentiellement présents dans les produits fermentés dans lesquels *B. bruxellensis* se développe. À noter le cas particulier du galactose, qui induit un comportement Crabtree négatif, lorsque la source d'azote associée est le sulfate d'ammonium, ce qui ne se produit pas chez *S. cerevisiae*. Ce phénotype n'est pas associé à l'absence d'enzymes de métabolisme fermentaire. De manière intéressante, lorsqu'on remplace l'ammonium par du nitrate, le métabolisme de la levure devient fermentaire (Muktaduzzaman *et al.*, 2015).

Tableau 3 : Informations sur les métabolismes et les substrats associés aux sources carbonées consommées par *Brettanomyces bruxellensis* dans la littérature.

Sources carbonées	Bibliographie associée à sa physiologie	Substrats
Hexoses		
Glucose, fructose, mannose	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> 2015) et fermentaire en présence et en absence d'oxygène (Galafassi <i>et al.</i> , 2011 ; Rozpedowska <i>et al.</i> , 2011 ; Leite <i>et al.</i> , 2013)	
Galactose*	En présence d'oxygène, métabolisme variable selon la source d'azote: respiratoire sous sulfate d'ammonium et fermentaire en présence de nitrate (Moktaduzzaman <i>et al.</i> , 2015). Soumis à la répression catabolique par le glucose	Sucres résiduels présents dans le vin en fin de fermentation alcoolique
Lactose*	Métabolisme oxydatif chez toutes les souches étudiées (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> 2015) et fermentaire en présence d'oxygène, faible vitesse de croissance (Leite <i>et al.</i> , 2013).	
Pentoses		
Ribose	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015)	non consommés par <i>S. cerevisiae</i> pendant la FA, sucres résiduels présents dans le vin
Arabinose*		
Xylose*	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015) chez toutes les souches. Conterno <i>et al.</i> , 2006: aucune souche ne l'utilise.	
Polyols		
Mannitol*	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015). Conterno <i>et al.</i> 2006	Raisin
Glycérol*, Acides organiques*, Ethanol*	Métabolisme respiratoire (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> 2015). Pas assimilables en conditions limitantes en oxygène (Vigentini <i>et al.</i> , 2008).	Glycérol : présent dans les produits fermentés par <i>S. cerevisiae</i> - Vin: 3-14g/L (Kunkee et Eschnauer, 2003) Acides organiques : Vin
Sucres complexes		
Maltose*	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015) et fermentaire en présence d'oxygène (Leite <i>et al.</i> , 2013).	Vin
Tréhalose	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015; Conterno <i>et al.</i> , 2006). Utilisé par <i>B. bruxellensis</i> dans le vin (Chatonnet <i>et al.</i> , 1995)	Vin (hydrolyse des levures en fin FA)
Cellobiose*	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015). Dégradation en éthanol par la β -glucosidase (Blondin <i>et al.</i> , 1982; Tiukova <i>et al.</i> , 2013; Blomqvist <i>et al.</i> , 2010). Phénotype positif associé à la présence d'un gène codant pour un type de β -glucosidase, absent chez les souches de bière (Crauwels <i>et al.</i> , 2015)	Bioéthanol Bois des barriques (vin et bière)
Dextrines	Métabolisme oxydatif (Biolog; Crauwels <i>et al.</i> , 2015).	Sucres résiduels de la bière

*Consommation souche-dépendante.

3 Diversité génétique de *B. bruxellensis*. Lien avec la variabilité phénotypique

3.1 Diversité génétique de *B. bruxellensis*

3.1.1 Caractéristiques

Ces 15 dernières années, plusieurs travaux ont été menés sur la diversité intra-spécifique de l'espèce ainsi que sur l'organisation chromosomique et génomique. L'utilisation d'outils, tels que l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD en anglais), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), l'analyse du polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial, l'électrophorèse en champs pulsé (REA-PFGE) et la Sau-PCR, seuls ou en combinaison, a permis de mettre en évidence **une diversité génétique importante** au sein de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* (Mitrakul *et al.*, 1999 ; Conterno *et al.*, 2006 ; Martorell *et al.*, 2006 ; Curtin *et al.*, 2007 et 2012b ; Miot-Sertier et Lonvaud-Funel, 2007 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Oelofse *et al.*, 2009 ; Campolongo *et al.*, 2010 ; Vigentini *et al.*, 2012 ; Di Toro *et al.*, 2015).

De manière générale, la configuration chromosomique est conservée entre les individus d'une espèce. Néanmoins, *B. bruxellensis* présente un **caryotype variable** selon les souches. Hellborg et Piskur (2009) ont montré que celui varie entre 4 et 9 chromosomes, dont la taille est comprise entre 1 et 6 Mbp. Cette variabilité chromosomique pourrait être liée à l'absence de cycle sexuel observable chez *B. bruxellensis*.

La démocratisation des techniques de **séquençage haut-débit** a permis d'accéder à la structure, à l'organisation et au contenu du génome de *B. bruxellensis* (Tableau 4). Ces travaux récents confirment une variabilité importante entre les souches. Ils mettent en évidence le statut **polyploïde** (chaque cellule contient plus de deux sets complets de chromosomes) de l'espèce (Hellborg et Piskur, 2009), certaines souches étant **diploïdes (2n)**, d'autres **triploïdes (3n)** (Tableau 4). À l'heure actuelle, l'état haploïde n'a pas été retrouvé chez *B. bruxellensis*. Les souches présentent deux sets de chromosomes modérément hétérozygotes qui forment un core génome diploïde (Figure 8). Les individus triploïdes possèdent un génome additionnel, divergent du core génome diploïde (Curtin *et al.*, 2012 ; Borneman *et al.*, 2014 ; Crauwels *et al.*, 2014, 2015 ; Fournier, Gounot *et al.*, 2017). L'acquisition de cette troisième copie serait liée à un évènement **d'hybridation interspécifique**. Il reste à déterminer si l'espèce « donneuse » de la copie divergente est une espèce relativement proche ou distante de *B. bruxellensis* (Curtin et Pretorius, 2014). L'étude de deux souches triploïdes (AWRI 1499 et AWRI 1608) a également montré que

leur génome additionnel étaient différents, ce qui suggère qu'aux moins deux évènements d'hybridation ont eu lieu de manière indépendante (Borneman *et al.*, 2014).

La comparaison de génomes a également mis en évidence des évènements d'insertions, de délétions, de duplications génomiques ainsi que des pertes d'hétérozygotie à l'origine de cette variabilité (Borneman *et al.*, 2014 ; Crauwels *et al.*, 2014). Ishchuk *et al.* (2016) ont récemment montré la présence de locus centromériques particuliers chez la souche CBS2499 favorisant les réarrangements génomiques et les shifts dans le niveau de ploïdie. Ainsi, la variabilité génétique importante observée au sein de l'espèce résulte donc des différences de niveau de ploïdie, ainsi que de mécanismes de réarrangements chromosomiques (Hellborg et Piskur, 2009 ; Fournier, Gounot *et al.*, 2017). Le séquençage de génomes de haute qualité va permettre dans l'avenir de travailler à l'identification des caractéristiques adaptatives de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* (Olsen *et al.*, 2015 ; Fournier, Gounot *et al.*, 2017).

Tableau 4 : Souches de l'espèce *B. bruxellensis* dont le génome est séquençé.

Souche séquençée	Substrat d'origine	Zone géographique		Référence
		géographique	Niveau de ploïdie	
CBS 2499	Vin	France	Diploïde	Piskur <i>et al.</i> , 2012
AWRI 1499	Vin	Australie	Triploïde	Curtin <i>et al.</i> , 2012a
AWRI 1608	Vin	Australie	Triploïde	Borneman <i>et al.</i> , 2014
AWRI 1613	Vin	Australie	Triploïde	Borneman <i>et al.</i> , 2014
LAMAP2480	Vin	Chili	NA	Valdes <i>et al.</i> , 2014
ST05.12/22	Bière	Belgique	Diploïde	Crauwels <i>et al.</i> , 2014
CBS6055	Dry ginger ale	Etats-Unis	Triploïde	Crauwels <i>et al.</i> , 2015
ST05.12/26	Bière	Belgique	Diploïde	Crauwels <i>et al.</i> , 2015
ST05.12/48	Bière	Belgique	Diploïde	Crauwels <i>et al.</i> , 2015
ST05.12/53	Bière	Belgique	Triploïde	Crauwels <i>et al.</i> , 2015
CBS11270	Bioéthanol	Suède	Diploïde	Olsen <i>et al.</i> , 2015
UMY321	Vin	Italie	Diploïde	Fournier <i>et al.</i> , 2017

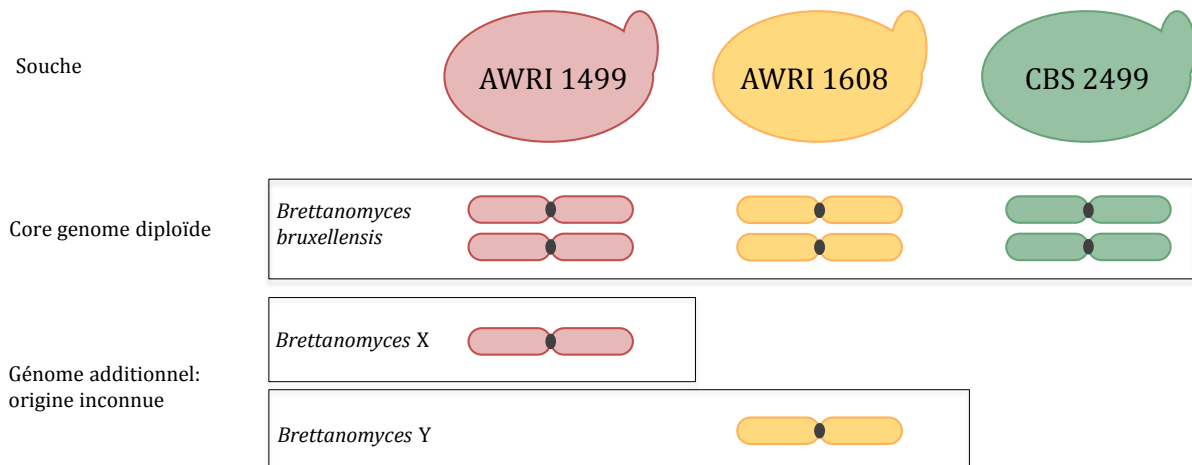


Figure 8 : Représentation schématique des génomes des souches AWRI 1499, AWRI 1608 et CBS 2499 de *B. bruxellensis* (Borneman *et al.*, 2014).

Chaque souche contient un set diploïde de chromosomes conservé. Les souches AWRI 1499 et AWRI 1608 contiennent un troisième set complet de chromosomes qui est unique à chacune de ces deux souches (*Brettanomyces X* et *Brettanomyces Y*).

3.1.2 L'outil microsatellite pour étudier la diversité et la structure de la population

La disponibilité de la séquence de la souche AWRI 1499 a permis le développement d'un outil de génotypage à partir de marqueurs microsatellites spécifiques de *B. bruxellensis* (Albertin *et al.*, 2014). Les microsatellites sont des séquences d'ADN de 1 à 6 nucléotides répétés 10 à 30 fois en tandem naturellement présents dans les génomes eucaryotes. La structure répétée de leur séquence leur donne des caractéristiques particulières d'un point de vue évolutif : par rapport aux autres séquences du génome, ils présentent des taux élevés de mutation allant de 10^{-6} à 10^{-4} évènements par locus par génération chez la levure (Pelletier *et al.*, 2003 ; Lynch *et al.*, 2008). De plus, les mutations qui touchent les microsatellites résultent en une augmentation ou une diminution du nombre de répétitions selon un *Two-phase-model* (Di Rienzo *et al.*, 1994). Généralement, elles correspondent à des évènements d'ajouts ou de délétions d'une seule répétition et plus rarement à ajouts ou délétions d'un grand nombre de répétitions. Du fait de ces mutations, un locus microsatellite peut présenter un polymorphisme important et avoir plusieurs allèles, différents par leurs nombres de répétition et donc de taille. Ces marqueurs sont co-dominants et donc utilisables pour l'étude de populations complexes, mettant en évidence des états aneuploïdes ou polyploïdes. Chaque souche est discriminée selon son génotype (i.e. : nombre et type d'allèles pour chaque locus microsatellite étudié). Ainsi la diversité génétique d'une population peut être évaluée avec l'observation de plusieurs locus microsatellites polymorphes dans une population. Ces marqueurs moléculaires ont déjà été employés avec succès pour le

génotypage de populations complexes (Schlötterer, 2001) telles que l'Homme (Rosenberg *et al.*, 2002) ou *S. cerevisiae* (Legras *et al.* 2007; Schuller et Casal 2007; Richards *et al.*, 2009; Goddard *et al.*, 2010 ; Viel *et al.*, 2017). Au contraire des méthodes citées en début de chapitre, ces marqueurs permettent l'analyse des relations génétiques entre souches et peuvent donc donner des informations sur la structure et la diversité de la population, le mode de dissémination de cette levure et son évolution (Guichoux *et al.*, 2011 ; Vieira *et al.*, 2016). L'analyse des relations génétiques fait appel à des méthodes de calcul de distance génétique entre les génotypes déterminés par analyse microsatellite. La difficulté posée par la génétique de *B. bruxellensis* vient des différences en niveau de ploïdie. Pour la surmonter, il existe la méthode de calcul de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004) qui permet de comparer des souches avec différents niveaux de ploïdie. Un autre avantage de cette méthode est sa portabilité, qui permet une comparaison des résultats entre les différents laboratoires. Ce n'est par exemple par le cas de la RAPD, sujette à des variations inter laboratoires.

3.2 Origine de la variabilité génétique

3.2.1 Lien entre la niche écologique et la variabilité génétique

Plusieurs études suggèrent une corrélation entre les profils génétiques et la source d'isolement des souches de *B. bruxellensis* (Conterno *et al.*, 2006 ; Vigentini *et al.*, 2012 ; Crauwels *et al.*, 2014). Ainsi, dans le panel de souches qu'ils génotypent (*par RAPD-PCR, Arbitrary Primer-PCR et repetitive sequence-based PCR*), Crauwels *et al.* (2014) montrent que les isolats de boissons non alcoolisées forment un groupe génétique séparé des souches de vin et de bière.

D'autre part, certains auteurs ont mis en évidence des profils génétiques ou génotypes prédominants, c'est-à-dire plus fréquemment isolés que les autres (Conterno *et al.*, 2006 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Curtin *et al.*, 2012). Curtin (*par AFLP-PCR et 26S rDNA*, 2007 et 2012a) a notamment montré que 92% des souches isolées de vin et d'origine australienne étaient triploïdes et partageaient un génotype commun avec la souche AWRI1499, suggérant une adaptation importante de ce génotype au vin. Campolongo (*Sau-PCR*, 2010) met également en évidence un regroupement des profils génétiques des individus en fonction du contenant d'isolement, cuve ou bouteille, ce qui pourrait témoigner d'une sélection des génotypes en fonction du stade d'élaboration du vin.

3.2.2 Lien entre l'origine géographique et la variabilité génétique

L'influence de l'origine géographique sur la variabilité génétique de l'espèce *B. bruxellensis* reste controversée. À l'échelle internationale, Conterno *et al.* (26S rDNA, 2006) observent sur 47

souches isolées du monde entier, un lien entre la répartition des profils génétiques et l'origine géographique des souches, mais ce résultat n'est pas retrouvé par Vigentini *et al.* (ISS-PCR, 2012), Albertin *et al.* (microsatellites, 2014) ou Crauwels *et al.* (2014). A l'échelle d'un pays comme l'Italie, Vigentini *et al.* (2012) n'observent pas de populations de *B. bruxellensis* spécifiques d'un territoire. A l'échelle régionale, là encore les résultats sont contradictoires selon les études. L'étude de Curtin *et al.* (2007) sur la biodiversité dans 31 régions viticoles d'Australie montre la présence de trois génotypes dominants retrouvés sur plusieurs régions. A l'inverse, Campolongo *et al.* (2010) observent un lien entre la répartition des profils génétiques et la zone géographique d'isolement des souches (Piedmont ou Ligurie, Nord-Ouest de l'Italie).

À l'échelle d'un vignoble, certains génotypes apparaissent également spécifiques de certains châteaux (Martorell *et al.*, mtDNA restriction analysis et RAPD-PCR, 2006). Des populations clonales peuvent être retrouvées dans un même château sur plusieurs décennies (Albertin *et al.*, 2014). Cette observation est en accord avec la capacité de certaines souches de *B. bruxellensis* à survivre dans les vins sur de longues périodes (Fugelsang et Zoecklein, 2003). En outre, les travaux d'Albertin *et al.* (2014) montrent un degré de similarité important entre les souches de grappe et de vin d'un même château pour un même millésime, ce qui suggère une connexion étroite entre les deux. Par ailleurs, des individus associés à des clusters génétiques différents peuvent être retrouvés simultanément dans un même château, mettant en évidence une diversité intra-spécifique importante à l'échelle du chai (Barbin *et al.*, ITS-PCR/Enzyme de restriction/Pulse Field Electrophoresis, 2008 ; Campolongo *et al.*, 2010 et Di Toro *et al.*, SAU-PCR, 2014).

Deux phénomènes sont donc mis en évidence :

- Des **génotypes spécifiques de certaines régions/châteaux/vins** semblent exister. Certaines pratiques de vinification ou types de vin pourraient constituer un facteur de sélection et/ou une pression évolutive.
- Des isolats distants géographiquement (ex : Europe vs Californie...) peuvent partager un profil génétique proche, voire similaire, ce qui suggère une **dissémination de l'espèce à l'échelle du globe**. Dans le domaine œnologique, de multiples vecteurs pourraient avoir participé à cette dispersion : les hommes, les insectes, les particules transportées par les émissions de CO₂ lors des fermentations, l'échange de matériel biologique, d'équipements de vinification, de vins (Bokulich *et al.*, 2013).

3.3 Effet de la variabilité génétique sur la physiologie de *Brettanomyces bruxellensis*

3.3.1 Effet sur la croissance et la tolérance aux milieux hostiles

Agnolucci *et al.* (*mtDNA restriction analysis et RAPD-PCR*, 2009) ont montré une corrélation entre la vitesse de croissance des individus et leur appartenance à un **cluster génétique**. Ils ne notent pas de différence significative entre les individus au sein d'un cluster. L'étude du lien entre niveau de ploïdie et croissance n'a, à l'heure actuelle, pas été réalisée. Si de tels liens existent, ils pourraient expliquer les variations importantes voire les contradictions entre études concernant les profils de croissance et les rendements de biomasse formée selon les souches étudiées (Fugelsang et Zoecklein, 2003 ; Barbin *et al.*, 2008 ; Romano *et al.*, 2008 ; Vigentini *et al.*, 2008 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Oelofse *et al.*, 2009).

Ces variations pourraient être amplifiées par l'emploi de milieux de culture différents, ainsi que par l'hétérogénéité intraspécifique de *Brettanomyces bruxellensis* en termes de résistance aux facteurs abiotiques tels que le pH, l'éthanol, l'oxygène, la température (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; du Toit *et al.*, 2005 ; Conterno *et al.*, 2006 ; Barata *et al.*, 2008b ; Benito *et al.*, 2009a et b ; Oelofse *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009 ; Agnolucci *et al.*, 2010 ; Curtin *et al.*, 2012b ; Vigentini *et al.*, 2013 ; Capusoni *et al.*, 2016). La teneur minimale en SO₂ actif efficace varie également selon les souches (Conterno *et al.*, 2006 ; Barata *et al.*, 2008a ; Curtin *et al.*, 2012b, Vigentini *et al.*, 2013 ; Longin *et al.*, 2016a).

Un lien entre matrice d'isolement et croissance dans certains milieux a parfois été proposé. Lui aussi pourrait avoir une base génétique. Ainsi, les souches de vin seraient les plus adaptées à la survie dans le vin (Renouf *et al.*, 2009 ; Crauwels *et al.*, 2017). Les souches provenant d'autres substrats (bière, boissons non alcoolisées) s'y développent peu voire pas, ce qui suggère la perte de certains équipements métaboliques. Cela peut également et de manière non exclusive, être dû à l'acquisition de nouveaux caractères par les souches évoluant dans le vin.

3.3.2 Effet sur le métabolisme carboné

Conterno *et al.* (2006) ont observé une corrélation entre la capacité à métaboliser certains substrats (éthanol, maltose, glycérol et amidon...) et l'appartenance à un groupe génétique. La comparaison de génomes a permis d'identifier des différences génétiques, i.e. la présence ou l'absence de certains gènes, expliquant ces phénotypes. Ainsi, Crauwels *et al.* (2015) observent que la dégradation du maltose est associée à la présence du gène codant pour l'enzyme de dégradation correspondante, la maltase. Ces auteurs suggèrent également qu'il existe un lien entre matrice d'isolement des souches et capacité à consommer certains substrats. Les souches de bière étudiées ne semblent par exemple pas capables d'oxyder le galactose et le cellobiose contrairement aux isolats de vin et de boissons non alcoolisées (Crauwels *et al.*, 2015). Ceci pourrait être lié à la perte, chez toutes les souches de bière, d'une partie ou de la totalité d'un cluster de 13 gènes, potentiellement impliqués dans le métabolisme carboné. Ce cluster comprend notamment des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose ainsi que celui codant pour une β -glucosidase (enzyme permettant l'hydrolyse des liaisons β -1,4 du cellobiose) (Crauwels *et al.*, 2014 et 2015).

4 Contamination et altération des vins rouges par *Brettanomyces bruxellensis*.

4.1 Contamination des vins rouges par *Brettanomyces bruxellensis*

4.1.1 Un peu d'histoire...

Le premier isolement de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin a eu lieu en 1933 dans un **moût de raisin** issu d'un vignoble français (Krumbholz et Tauschanoff, 1933). La présence de *B. bruxellensis* dans les vins est probablement ancienne. Elle a notamment été isolée et identifiée dans des bouteilles datant du début du XXème siècle (1909) (Renouf *et al.*, 2007 ; Albertin *et al.*, 2014).

Sa présence est également associée à **diverses régions viti-vinicoles du monde**, parmi lesquelles le midi de la France (Galzy et Rioux, 1955), les appellations Graves, Médoc, Haut-Médoc, Margaux, Montagne-St Emilion, Pessac-Léognan, Graves et Saint-Emilion ainsi qu'en Bourgogne (Serpaggi *et al.*, 2012), dans les côtes du Rhône (Longin *et al.*, 2016b), le Madiran (Domercq, 1956 ; Chatonnet *et al.*, 1992), l'Allemagne (Schanderl et Draczynski, 1952), l'Italie (Florenzano, 1950 et 1951), l'Afrique du Sud (van der Walt et van Kerken, 1958), le Brésil (Zardetto de Toledo *et al.*, 1959), l'Espagne (Arjun, 1979), le Portugal (Henschke, 1996), la Nouvelle-Zélande (Wright et Parle, 1974), l'Australie (Heresztyn, 1986b) et les Etats-Unis (Hock, 1990).

Elle a majoritairement été isolée à partir de **vins rouges**, mais peut également se développer dans le vin blanc (Heresztyn, 1986b ; Licker *et al.*, 1998 ; Dias *et al.*, 2003b). Malgré la présence des précurseurs des composés d'altération à des concentrations comparables à celles du vin rouge (Gorinstein *et al.*, 2000), l'altération des vins blancs est moins fréquemment rapportée. Ce phénomène serait lié à une diminution de la viabilité corrélée aux pH bas des vins blancs, induisant une absence ou une production moindre de phénols volatils dans les vins blancs (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003 et 2006). En conséquence, la majorité des recherches en conditions œnologiques a lieu dans les vins rouges.

4.1.2 Les sources de contamination et de dissémination

Les sources de contamination des vins par *Brettanomyces bruxellensis* sont multiples. Isolée de différents types de sources viti-vinicoles, la source initiale et les mécanismes de dispersion de cette levure font débat et ne sont à l'heure actuelle, pas clairement identifiés. Davenport (1976) n'a retrouvé aucun isolat de *B. bruxellensis* au niveau du sol, des racines, de l'écorce, des feuilles et de la grappe. Malgré qu'elle ait fréquemment été identifiée dans des moûts

en fermentation, seules quelques études ont identifié sa présence à la surface de la **baie de raisin** (Guerzoni et Marchetti, 1987 ; Barbin *et al.*, 2006 ; Renouf et Lonvaud-Funel, 2007a). Une hypothèse est que *B. bruxellensis* serait présente à de très faibles niveaux de population dans un écosystème dominé par de multiples espèces. Ceci est également le cas de *S. cerevisiae* qui est détecté à la surface des baies à des niveaux de population beaucoup moins importants que d'autres espèces (Goddard et Greig, 2015). Des milieux d'enrichissement ont permis de détecter la présence de *B. bruxellensis* sur les baies dans différents vignobles et à différents stades de maturité (Barbin *et al.*, 2006 ; Renouf et Lonvaud-Funel, 2007a). En outre, sa présence dans les **moûts** et sur le raisin serait plus fréquente en cas de contamination par la pourriture acide (Guerzoni et Marchetti, 1987 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006).

Au chai, sa présence a été relevée dans l'air, sur les murs ainsi que sur les différents équipements (pompes, lignes de transfert...) (Fugelsang, 1998 ; Connel *et al.*, 2002). Les équipements contaminés lors des millésimes précédents et mal nettoyés ont longtemps été considérés comme vecteurs majoritaires de *B. bruxellensis* (Boulton *et al.*, 1996 ; Fugelsang et Edwards, 2007). Malgré les progrès réalisés en termes de nettoyage des équipements, ceux-ci restent une source de contamination importante. La capacité de certaines souches de *B. bruxellensis* à former des **biofilms** leur permet probablement de résister aux procédures de nettoyage actuelles (Joseph *et al.*, 2007 ; Oelofse, 2008 ; Galafassi *et al.*, 2015).

Les **humains** et les **insectes** sont également des vecteurs de contamination et de dispersion. Il a notamment été montré que la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* peut être un vecteur de transport de cette levure, avec lequel elle établit une relation de type mutualisme (Shehata et Mrak, 1951 ; van der Walt et van Kerken, 1959 ; Martorell *et al.*, 2006).

Dans le vin, *Brettanomyces bruxellensis* peut être retrouvée à chacune des étapes de vinification (Martorell *et al.*, 2006). En début de fermentation alcoolique (FA), *B. bruxellensis* est présente dans les moûts, mais ce sont les autres espèces de non-*Saccharomyces* (NS), puis *S. cerevisiae*, qui dominent (Renouf, 2006b). Elle apparaît en effet moins adaptée au milieu riche en sucre qu'est le moût en début de fermentation (Barata *et al.*, 2008a ; Nardi *et al.*, 2010). Dans le cas de **FA languissantes**, inoculées ou non, *B. bruxellensis* peut profiter de la baisse d'activité de *S. cerevisiae* pour se développer et terminer la fermentation. L'ajout massif de *S. cerevisiae* par le biais du levurage reste une stratégie de choix pour l'établissement rapide d'une population élevée, essentielle pour occuper l'écosystème durant toute la FA.

B. bruxellensis est particulièrement adaptée au milieu difficile qu'est le vin en fin de FA (Nardi *et al.*, 2010). Elle est la seule espèce NS à subsister et profite de la baisse d'activité de *S. cerevisiae* pour se développer, même si les niveaux de population restent relativement faibles.

Même si elle ne se développe pas nécessairement en fin de FA, c'est à ce moment-là qu'elle peut s'implanter comme une espèce majoritaire (Renouf, 2006b).

La **FML et l'élevage en barrique** sont reconnus comme étant **les stades critiques** de développement de *B. bruxellensis* dans le vin (Chatonnet *et al.*, 1992 et 1995 ; Licker *et al.*, 1998 ; Renouf *et al.*, 2006a ; Suárez *et al.*, 2007 ; Oelofse, 2008). Ces levures ont également été identifiées dans des vins stockés en cuve (inox ou béton) (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Rodrigues *et al.*, 2001). Elles peuvent également se développer et être isolées en **bouteille** (Renouf, 2006).

Pendant la FML, les faibles concentrations en SO₂ libre, l'augmentation du pH et la libération de nutriments tels que le tréhalose par l'autolyse des levures seraient favorables à la croissance de *B. bruxellensis* (Renouf, 2006 ; Oelofse, 2008). D'autre part, des durées de FML longues peuvent favoriser le développement de *B. bruxellensis*, alors que des populations élevées (10⁶UFC/mL) d'*O. oeni* pourraient retarder le développement de *Brettanomyces bruxellensis* (Renouf, 2006). Néanmoins, *O. oeni*, principal acteur de la FML, ne semble pas inhiber parfaitement le développement de *Brettanomyces* et/ou ce phénomène serait souche-dépendant.

Lors de l'élevage du vin en barriques, *B. bruxellensis* peut survivre dans les lies, autour de la bonde ainsi que dans le bois (Laureano *et al.*, 2005). Le vin permet la diffusion de ces levures dans les fissures et les pores des douelles de bois (jusqu'à 8mm) (Fugelsang, 1997 ; Laureano *et al.*, 2005). Cela leur fournit une protection contre le SO₂ et leur permet de se développer grâce à l'hydrolyse des sources carbonées disponibles et notamment la libération de cellobiose (Fugelsang, 1997 ; Swaffield *et al.*, 1997 ; Oelofse, 2008). La diffusion de faibles quantités d'**oxygène** à travers les espaces entre les douelles et à travers le bois peut stimuler sa croissance et réduire les quantités en SO₂ actif contre les levures (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006, Qiu Y., 2015).

Enfin, l'observation empirique et les travaux de Chatonnet (1992) ont montré que l'altération par *B. bruxellensis* durant l'élevage était particulièrement importante pendant les **mois d'été**.

4.2 Formation de phénols volatils et altération du vin

La présence de *B. bruxellensis* est depuis longtemps associée à des effets néfastes sur les qualités visuelles et organoleptiques du vin (Peynaud et Domercq, 1956 ; van der Walt et van Kerken, 1961). Son potentiel d'altération est notamment lié à la formation de **biofilms**, à la **perte d'intensité colorante**, à la production **d'acidité volatile**, au **goût de souris** (production de tétrahydropyridines) à la production **d'amines biogènes**, d'acide isovalérique et de certains acides gras responsables d'arômes « rances », mais surtout à la production de **phénols volatils** (Heresztyn, 1986a et b; Chatonnet, 1992, 1995 ; Fugelsang, 1993 ; 1997 ; Licker *et al.*, 1998 ; Mansfield, 2002 ; Caruso *et al.*, 2002 ; Aguilar Uscanga *et al.*, 2003 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003; Snowden *et al.*, 2006 ; Vigentini *et al.*, 2008 ; Agnolucci *et al.*, 2009).

D'un point de vue organoleptique, la présence de *B. bruxellensis* est associée à un espace sensoriel caractéristique (« Brett character » en anglais) très varié de par la diversité des composés aromatiques actifs dans le vin qu'elle produit (Licker *et al.*, 1998 ; Albino, 2011 ; Joseph *et al.*, 2013, 2015 et 2017). Ces arômes peuvent avoir des impacts positifs ou négatifs, mais, sur les 95 souches testées par Joseph *et al.* (2015) aucune n'est exclusivement associée à des arômes jugés positifs. Leur production peut être observée pendant la FML, mais plus souvent pendant l'élevage, en particulier en barrique (Chatonnet *et al.*, 1992).

4.2.1 Définition des phénols volatils

Les phénols volatils (PVs) sont une famille de composés aromatiques communément retrouvés dans de nombreux produits de l'agroalimentaire (Nykänen et Suomalainen, 1983 ; Maarse et Visscher, 1989). Ce terme fait en général référence aux éthyls phénols: le **4-éthylphénol** (4EP), **4-éthylguaïacol** (4EG), **4-éthylcatéchol** (4EC) et aux vinyls phénols correspondants, respectivement le **4-vinylphénol** (4VP), **4-vinylguaïacol** (4VG) et **4-vinylcatécol** (4VC) (Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003). Le 4VC et le 4EC sont peu étudiés dans le vin. On retrouve principalement des vinyls phénols dans les vins blancs et des éthyls phénols dans les vins rouges (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Boidron *et al.*, 1998).

Si les moûts contiennent en général peu de phénols volatils (Baumes, 1988), les vins peuvent en contenir des quantités de l'ordre du mg/L (Licker *et al.*, 1998). Les phénols volatils interfèrent avec l'arôme fruité et diminuent la perception hédonique des vins (Lattey *et al.*, 2010 ; Tempère *et al.*, 2016). Une étude en 2008 montrait que sur 10 000 vins présentés à l'International Wine Challenge à Londres, les vins associés à des déviations phénolées représentaient 15,7% du total des vins à défaut et 1% de la totalité des vins (Goode et Harrop, 2008). En 1992, Chatonnet identifie la présence du 4EP (« cuir », « écurie », « sueur »), 4EG (« épice », « clou de girofle »), 4VP

(« odeur médicinale ») dans des vins jugés phénolés. Il détermine les seuils de perception (**SP**) dans l'eau, dans une solution modèle et dans un vin ainsi que le seuil de rejet (**SR**) ou limite de préférence dans le vin (Tableau 5). Ces résultats montrent que le 4EG est plus facilement perçu que le 4EP. De plus, il faut toujours considérer la somme du 4EP et du 4EG, lors des dosages car la présence de dérivés 2-méthoxylés diminue les seuils de perception et de rejet, comme on peut le voir dans le Tableau 5 (Chatonnet *et al.*, 1992).

Tableau 5 : Limites de perception (LP) du 4EP et du 4EG dans l'H₂O, en solution hydroalcoolique et dans un vin rouge (Chatonnet, 1992).

Phénols volatils	SP dans H ₂ O (µg/L)	SP dans solution hydroalcoolique (µg/L)	SR dans un vin (µg/L)
4EP	130	440	620
4EG	25	47	140
4EP+4EG (10 :1)	-	-	426

SP : concentration à laquelle moins de 50% du panel échoue statistiquement à repérer la molécule
SR : concentration au-delà de laquelle plus de 50% du panel rejette l'échantillon

Néanmoins, il est difficile de définir une concentration critique pour tous les vins car la perception du « caractère Brett » dépend de la structure aromatique globale du vin, de son âge et du cépage (Phister et Mills, 2003). L'impact aromatique de *B. bruxellensis* dans le vin est probablement issu de la combinaison de ces arômes aux phénols volatils (Romano *et al.*, 2008 ; Joseph *et al.*, 2017). Les vins jeunes y seraient plus sensibles que des grands vins rouges (Arvik et Henick-Kling, 2005). Le seuil de perception est également variable selon les individus (Tempère *et al.*, 2014).

4.2.2 Biosynthèse des phénols volatils

Les phénols volatils sont issus du catabolisme des **acides hydroxycinnamiques** (AHCs) contenus dans le malt ainsi que dans le vin. Ceux-ci sont localisés dans les vacuoles des cellules de la pulpe et la peau du raisin. Ils y sont principalement retrouvés sous forme estérifiés (acides p-coutarique, fertarique et caftarique) (Conde *et al.*, 2007). Dans le vin, les AHCs estérifiés ne sont pas métabolisés par *Brettanomyces bruxellensis* (Schopp *et al.*, 2013). Au cours de la fermentation, ils peuvent subir une hydrolyse acide lente ou être dégradés par les enzymes exogènes (raisin, levure) pour former les AHCs non estérifiées, respectivement les **acides para-coumarique, férulique et caféique** dont les concentrations varient en fonction des conditions de culture, de vinification et du millésime (Nagel et Wulf, 1979 ; Garcia-Falcon *et al.*, 2007 ; Ginjom *et al.*, 2011). Certaines souches d'*O. oeni*, acteur de la FML, présentent une activité cinnamoyl estérase et

dégradent les formes estérifiées des AHCs en formes non estérifiées. Néanmoins, les auteurs n'ont pas observé de lien entre l'augmentation de la disponibilité en AHCs non estérifiés et la production en phénols volatils par *B. bruxellensis* dans les conditions étudiées (Madsen *et al.*, 2016).

La production des phénols volatils consiste en une première étape de production et de stockage de vinyls phénols suivi d'une seconde étape de consommation des vinyls et de production des éthyl phénols. Elle implique l'activité séquentielle de deux enzymes sur les acides hydroxycinnamiques non estérifiés. La première enzyme, **l'hydroxycinnamate décarboxylase** transforme ces acides en hydroxystyrènes, les composés vinylés (Edlin *et al.*, 1998), qui sont ensuite réduits en composés éthyles sous l'effet de la **vinylphénol réductase** (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Suárez *et al.*, 2007) (Figure 9).

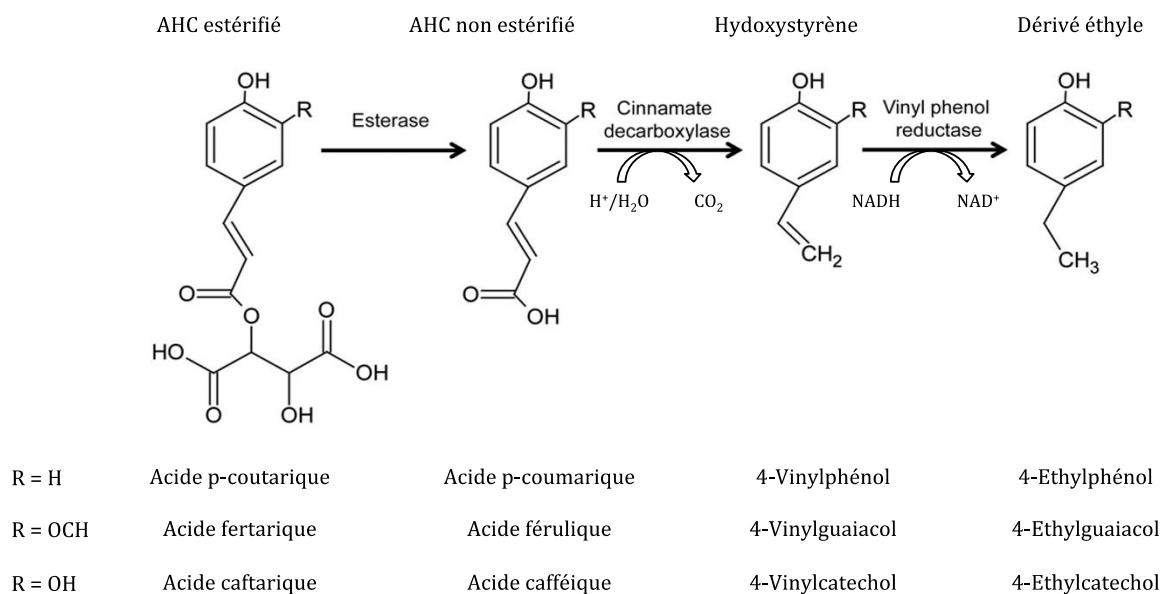


Figure 9 : Formation des phénols volatils par *Brettanomyces bruxellensis* (Adapté de Steensels *et al.*, 2015).

En milieu synthétique, les rendements de conversion des AHCs en PVs sont proches de 100% (Dias *et al.*, 2003a), mais sont moins importants dans le vin (Coronado *et al.*, 2015). Ce phénomène a plusieurs explications qui ne s'excluent pas. La présence de polyphénols dans le vin peut réduire de manière significative la volatilité des 4EP et 4EG (Petrozziello, 2014). Les vinyls formés peuvent également se complexer aux anthocyanes sous forme de pyranoanthocyanes (Benito *et al.*, 2009b), composés très stables en conditions œnologiques et qui ne peuvent être utilisés par *B. bruxellensis*.

Chez *B. bruxellensis*, les gènes codant la cinnamate décarboxylase et la vinylphénol réductase, respectivement le gène DbPAD et le gène DbVPR/SOD ont récemment été identifiés (Godoy *et al.*, 2014 ; Granato *et al.*, 2015). Leurs séquences semblent très conservées entre les

souches (Crauwels *et al.*, 2017). Néanmoins, Crauwels *et al.* (2017) montrent que les souches de bière présentent un seul variant de la vinylréductase, à la différence des souches de vin et de boissons gazeuses qui contiennent au moins un variant supplémentaire. Il reste à déterminer l'impact que cela aura sur la production en phénols volatils.

Des études laissent supposer que d'autres espèces que *B. bruxellensis* peuvent participer à la production de phénols volatils dans le vin : des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus pentosaceus* et *Pediococcus damnosus* (Chatonnet *et al.*, 1992 ; de las Rivas *et al.*, 2009), certaines levures du genre *Candida* (*mannitofaciens*, *versatilis*, *halophila*) ainsi que *Pichia guilliermondii* (Dias *et al.*, 2003b ; Martorell *et al.*, 2006). Certaines souches de *S. cerevisiae*, nommées HCDC⁺, sont capables de décarboxyler les acides hydroxycinnamiques en composés vinyls grâce à la présence d'une cinnamate décarboxylase codée par le gène POF1 (Benito *et al.*, 2009 ; Morata *et al.*, 2013). Dans le genre *Brettanomyces*, *B. bruxellensis* et *B. anomala* sont les seules espèces à produire des quantités importantes d'éthyls phénols de façon souche et milieu dépendants (Dias *et al.*, 2003b ; Conterno *et al.*, 2006 ; Vigentini *et al.*, 2008 ; Oelofse *et al.*, 2009). Néanmoins, *B. bruxellensis* étant l'espèce principalement retrouvée dans le vin, elle y est considérée comme le principal producteur de phénols volatils (Martorell *et al.*, 2006).

4.2.3 Analyse physiologique de la formation des phénols volatils

Toutes les souches de *B. bruxellensis* étudiées semblent capables de produire des phénols volatils (Martorell *et al.*, 2006 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Oelofse *et al.*, 2009). En revanche, les souches se distingueraient par la vitesse de production et la quantité produite (Martorell *et al.*, 2006 ; Barbin *et al.*, 2008 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009). Par ailleurs, pour une souche, les profils de production varient également en fonction du **milieu** (Di Toro *et al.*, 2015) et une variabilité plus importante entre les souches est généralement observée dans le vin comparativement aux autres milieux (Oelofse *et al.*, 2009 ; Crauwels *et al.*, 2017).

Le pH n'apparaît pas comme un paramètre limitant pour la croissance et la production en phénols volatils (PVs) dans un contexte œnologique: Bénito *et al.* (2009a) observent la production de PVs pour des pH entre 2,17 et 4,18. Dans le vin, un pH bas peut néanmoins avoir un impact sur l'action du SO₂ car il favorisera l'apparition de la forme moléculaire libre. La production en PVs peut être retardée à partir de concentrations en **éthanol** de 10% voire inhibée lorsqu'elles sont supérieures ou égales à 15% v/v (Dias *et al.*, 2003a ; Bénito *et al.*, 2009a). En milieu modèle, des concentrations de 5% v/v peuvent stimuler cette production (Bénito *et al.*, 2009a), probablement lié à la capacité de *Brettanomyces bruxellensis* d'utiliser l'éthanol comme source de carbone (Conterno *et al.*, 2006 ; Crauwels *et al.*, 2015).

De faibles concentrations (300mg/L) en **sucres** fermentescibles (glucose + fructose + galactose + tréhalose) permettent la production de phénols volatils (PVs) en quantités supérieures au seuil de rejet couramment admis (426µg/L en 4EP+4EG) dans le vin (Chatonnet *et al.*, 1992). Barata *et al.* (2008b) montrent qu'il y a production dès consommation de 0,2g/L de glucose + fructose en milieu modèle et que l'augmentation de la concentration en substrats carbonés induit une augmentation des vitesses de croissance et de production et des quantités de biomasse et de PVs. A l'inverse, Coulon *et al.* (2009) n'observent pas de liens entre les quantités en glucose et fructose consommées dans le vin et celles en PVs produites. Le tréhalose et l'acide acétique permettent la croissance, mais ne permettent pas d'obtenir des rendements supérieurs à 10% en PVs, alors que glucose et fructose permettent une conversion totale des acides cinnamiques (Dias *et al.*, 2003a). En l'absence de substrats carbonés, il n'y a pas production et l'acide p-coumarique n'est pas utilisé comme source de carbone ou d'énergie (Dias *et al.*, 2003a).

La production de phénols volatils dans le vin est possible dès 15°C (Barata *et al.*, 2008b; Zuehlke et Edwards, 2013) et permet l'accumulation de quantités supérieures au seuil de rejet admis (426µg/L, Chatonnet, 1992). L'augmentation de la **température** accélérerait croissance et production, mais ne modifierait pas les rendements finaux (Dias *et al.*, 2003a ; Barata *et al.*, 2008b).

Plus généralement, le lien entre production de phénols volatils et **croissance** n'a pas été clairement établi. Le niveau de production ne serait pas lié à la quantité de biomasse accumulée (Barbin *et al.*, 2008b ; Oelofse *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009 ; Di Toro *et al.*, 2015). En l'absence de croissance, il n'y aurait pas production de phénols volatils (Barata *et al.*, 2008 ; Coulon *et al.*, 2009). Il est à noter que Serpaggi *et al.* (2012) ont observé la production de 4EP par les cellules non cultivables (en état VNC), ce qui n'a pas été retrouvé par Longin *et al.* (2016). Dans le cas de cultures « actives » (cellules en croissance), les vinyls phénols sont produits dès la phase de latence et les éthyls phénols pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire en milieu synthétique (Dias *et al.*, 2003a ; Harris *et al.*, 2008 ; Coulon *et al.*, 2009) et dans le vin (Romano *et al.*, 2008). Ceci est confirmé par les travaux de Colorado (2015) sur les activités enzymatiques en milieu synthétique et milieu vin. Par ailleurs, Romano (2008) suggère qu'un niveau de population de 10^5 à 10^6 cell/mL doit être atteint dans le vin pour qu'il y ait production de phénols volatils, mais ce phénomène n'est pas retrouvé par Barata (2008b).

Ces contradictions pourraient être dues à la forte diversité génétique de l'espèce. En effet, la production de phénols volatils semble modulée par le **groupe génétique** d'appartenance des souches (Conterno *et al.*, 2006 ; Agnolucci *et al.*, 2009). Conterno *et al.* (2006) remarquent notamment l'existence d'un groupe génétique présentant à la fois une tolérance importante au

SO₂ et une production de quantités importantes de phénols volatils en milieu modèle ce qui pourrait se révéler particulièrement dangereux dans un contexte œnologique. Cette variabilité peut être dans certains cas, mise en relation avec le milieu d'origine de la souche et ses capacités de développement dans un milieu (Renouf *et al.*, 2009 ; Crauwels *et al.*, 2017). Les ratios de 4-éthylphénol sur 4-éthylguaïacol varient également selon la souche et le milieu considéré (Renouf *et al.*, 2009 ; Crauwels *et al.*, 2017). Dans le vin, les ratios (4EP/4EG) varient de 2 pour 1 à 10 pour 1 en fonction de la souche et du vin (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Renouf *et al.*, 2009 ; Crauwels *et al.*, 2017). A l'inverse, dans les bières de spécialité dans lesquelles la présence de ces composés peut être recherchée, les concentrations en 4EG sont supérieures à celles du 4EP (Curtin *et al.*, 2012a; Crauwels *et al.*, 2017).

Le bénéfice métabolique de la dégradation des AHCs est encore l'objet d'interrogations. Il a été suggéré que ce phénomène soit lié au maintien de la balance redox, la réduction des vinyls étant combinée à l'oxydation d'une molécule de NADH (Fugelsang, 1997 ; Duckitt, 2012 ; Smith et Divol, 2016). Une seconde théorie plaide pour une réaction de détoxification. *B. bruxellensis* dégraderait les acides phénoliques par décarboxylation pour les éliminer, car ces composés sont toxiques pour la cellule (Harris *et al.*, 2010 ; Carmona *et al.*, 2016). Dans la cellule, leur dissociation conduit à une acidification et donc un déséquilibre en du pH intracellulaire. Cette théorie est appuyée par une étude protéomique récente de la souche LAMAP2480 (Carmona *et al.*, 2016). Elle montre qu'en présence d'acide p-coumarique, de nombreuses voies métaboliques sont régulées afin d'augmenter la production en ATP et en NADH, nécessaires à la détoxification de la cellule.

Ses capacités d'altération, associées à la tolérance aux sulfites, et à sa capacité à survivre dans le vin sur de longues périodes de temps font de *B. bruxellensis* une espèce redoutée des vinificateurs (du Toit *et al.*, 2005 ; Nardi *et al.*, 2010).

4.3 Méthodes de détection, de prévention et d'élimination de *B. bruxellensis* et des phénomènes d'altération dans le vin

4.3.1 Méthodes de détection de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin

Un contrôle assidu des populations de *Brettanomyces bruxellensis* en présence au cours de la vinification est nécessaire à la prévention de son développement et de l'altération du vin. À ces fins, de nombreuses techniques ont été développées depuis le début du XXI^e siècle. La qualité de l'échantillonnage est déterminante: pour les vins en cuve, il est important de prélever en bas de cuve dans des conditions aseptiques et dans un flacon stérile. Pour les vins embouteillés, l'analyse est réalisée à partir d'une bouteille du lot suspecté.

4.3.1.1 *Suivi des phénols volatils*

Le suivi de la formation des phénols volatils est utilisé par certains vinificateurs comme marqueur d'altération par *Brettanomyces bruxellensis* (Domínguez *et al.*, 2002). Néanmoins, cette méthode ne renseigne pas sur l'évolution de la population et de la production en phénols volatils dans le temps.

4.3.1.2 *Croissance sur milieux sélectifs*

Une des méthodes couramment utilisée pour la détection de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin est **la mise en croissance sur milieu sélectif gélosé** ou liquide. De nombreux milieux spécifiques à la croissance de *B. bruxellensis* ont été développés (Rodriguez *et al.*, 2001). Certains exploitent la résistance de *B. bruxellensis* à des concentrations élevées en **actidione** (cycloheximide) (50mg/L) contrairement aux autres espèces de levure communément retrouvées dans le vin (Morneau *et al.*, 2011). D'autres permettent de détecter l'acidification du milieu par production d'acide acétique en aérobiose, la synthèse de phénols volatils à partir de précurseurs présents dans le milieu ou encore l'assimilation de différentes sources de carbone telles que l'éthanol (Rodriguez *et al.*, 2001). Ces méthodes sont simples à mettre en œuvre, peu coûteuses et permettent une quantification jusqu'à 1 Unité Formant Colonie (UFC) par millilitre de vin déposé.

Elles peuvent être complétées par des méthodes d'identification de l'espèce ayant été isolée telles que l'analyse par restriction d'ADN mitochondrial (Martorell *et al.*, 2006), la PCR RFLP (Restriction fragment length polymorphism (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999 ; Dias *et al.*, 2003b ;), la PCR RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Mitrakul *et al.*, 1999 ; Martorell *et al.*, 2006 ; Agnolucci *et al.*, 2009) ou encore des méthodes PCR ciblant l'ADN ribosomal (Ibéas *et al.*, 1996 ; Cocolin *et al.*, 2004).

Néanmoins, elles présentent des limitations importantes. La croissance lente de *B. bruxellensis* impose une durée d'incubation longue (entre 3 et 6 jours, parfois jusqu'à deux semaines à 25-30°C) (Rodriguez *et al.*, 2001). Ces méthodes sont donc inadaptées pour les suivis aux stades précoces de vinification (fermentations). Elles sont plus adaptées aux suivis mensuels ou trimestriels des populations pendant l'élevage. D'autre part, ces méthodes ne permettent pas d'accéder aux populations viables et non cultivables et peuvent donc sous-estimer la population de *Brettanomyces bruxellensis* en présence dans les vins (Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Divol et Lonvaud-Funel, 2005).

4.3.1.3 Méthodes cultures-indépendantes

Ces limitations ont conduit aux développements de **méthodes cultures-indépendantes** plus rapides et plus fiables pour la détection et la détermination des niveaux de population de « Brett » au cours de la vinification.

L'épifluorescence est une méthode de détection rapide et ne nécessite pas de culture préalable. Elle combine l'observation microscopique à l'utilisation de marqueurs de la viabilité cellulaire (iodure de propidium notamment). Elle permet ainsi d'identifier la présence d'une espèce et d'estimer sa population viable. Néanmoins, au vu de la diversité des aspects morphologiques adoptés par *Brettanomyces bruxellensis*, il peut se révéler difficile de l'identifier sur ce critère, notamment dans les échantillons aux stades fermentaires, riches en populations levuriennes. De plus, la limite de détection des cellules viables dans le vin par le biais de cette méthode est relativement élevée : $10^2 - 10^3$ cell/mL.

Les méthodes moléculaires telles que le marquage spécifique de l'ADN et la PCR quantitative permettent une meilleure spécificité, mais ont également des inconvénients. Stender *et al.*, (2001) ont notamment développé une technique de visualisation par microscopie de cellules fluorescentes de *B. bruxellensis* après hybridation *in situ* de sondes PNA espèce-spécifiques aux ARN ribosomiaux 26S (Hybridation ARN-FISH). Cette méthode efficace et sensible, présente l'avantage de ne pas nécessiter d'extraction d'ADN. Elle est néanmoins onéreuse et longue à mettre en place. Des techniques de **PCR quantitative** permettant la détection spécifique de *B. bruxellensis* directement à partir du vin ont été développées (Phister et Mills, 2003 ; Delaherche *et al.*, 2004 ; Agnolucci *et al.*, 2007 ; Tessonnière *et al.*, 2009 ; Campolongo *et al.*, 2010 ; Willenburg et Divol, 2012). Elles présentent l'avantage d'obtenir le résultat en 24 à 48h contre 7 jours pour les étalements sur boîte. L'extraction de l'ADN est un paramètre clé et plusieurs méthodes ont été développées afin d'assurer la pureté et l'absence d'inhibiteurs de la PCR dans l'extrait (Jara *et al.*, 2008 ; Tessonnière *et al.*, 2009). La qPCR détecte les cellules viables cultivables et non cultivables. Une étude a récemment été menée conjointement par trois laboratoires afin d'estimer la

variabilité entre trois kits de PCR quantitative commerciaux. Les résultats montrent qu'en fonction du kit, les populations de *B. bruxellensis* présentes dans des vins rouges pouvaient être sous-estimées (de 0,5 à 2,3 log₁₀ cell/mL) ou surestimées (0,5 à 1,1 log₁₀ cell/mL) comparativement aux populations obtenues sur milieu gélosé (Longin *et al.*, 2016b). La surestimation des populations peut être liée à la détection des populations VNC (Willenburg et Divol, 2012), dans des conditions de stress (ajout massif de SO₂ par exemple) notamment. Il s'agit d'un avantage important lorsqu'on veut considérer l'impact du sulfitage sur la population. Cette surestimation peut également être liée à l'amplification de l'ADN des cellules mortes (Andorrà *et al.*, 2010 ; Longin *et al.*, 2016b). Néanmoins, cet aspect peut être résolu par l'utilisation d'agents intercalants (Ethidium monoazide et Propidium monoazide bromide) qui révèlent la présence des cellules vivantes (Rawsthorne et Phister, 2009 ; Andorrà *et al.*, 2010). Les méthodes de détection par qPCR présentent des seuils de détection qui varient entre 10 et 10³ cell/mL selon les kits (Smith et Osborn, 2009 ; Willenburg et Divol, 2012). Elles nécessitent un personnel qualifié et sont assez onéreuses.

Récemment, des méthodes de numération par **cytométrie de flux** spécifiques de *B. bruxellensis* ont été mises au point. Elles permettent de détecter de manière spécifique et rapide ces populations dans les vins à des limites de détection de 10² cell/mL (Gerbaux, 2007 ; Serpaggi *et al.*, 2010). Cette technique informe également de la viabilité des cellules.

4.3.2 Méthodes de prévention et d'élimination

Le contrôle du développement de *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins nécessite l'utilisation de méthodes de prévention ou d'élimination. En fonction des situations, les vinificateurs peuvent utiliser plusieurs méthodes en combinaison.

4.3.2.1 **Le sulfitage**

Le sulfitage des vins est la méthode la plus couramment utilisée pour limiter le développement des microorganismes d'altération (Romano et Suzzi, 1993). Il est effectué par ajout de métabisulfite de potassium (K₂S₂O₅) en poudre ou de solutions de bisulfite d'ammonium (NH₄SO₃) ou de potassium (KHSO₃). Dans le vin, le dioxyde de soufre (SO₂) est présent sous différentes formes, le **SO₂ combiné** aux sucres, aux aldéhydes (éthanal) ou à des cétones, et le **SO₂ libre**, et la somme de ces formes représentent le SO₂ total. Seule une partie du SO₂ libre, la forme active (**H₂SO₃**) appelée **SO₂ moléculaire ou actif** présente des propriétés antiseptiques. L'équilibre entre cette forme active et la forme salifiée (HSO₃⁻) est fonction du **pH**, de la **température** et de la concentration en **éthanol** notamment. Plus le pH est bas, et la température et l'éthanol sont élevés, plus la part de SO₂ actif est importante (Rapport OIV-MA-AS323-04C).

En conséquence, la détermination de la teneur minimale en SO₂ actif efficace pour éliminer les populations de *B. bruxellensis* dans le vin est complexe et doit tenir compte de nombreux paramètres. L'efficacité du SO₂ moléculaire est également fonction de la teneur en **oxygène** (du Toit *et al.*, 2005). Les auteurs ont montré que 0,25mg/L de SO₂ actif affectaient de manière importante la cultivabilité de la souche de *B. bruxellensis* étudiée, néanmoins, sa population augmentait après exposition à l'oxygène. Les opérations de soutirage peuvent engendrer des apports d'oxygène et réduire la quantité de SO₂ présente, et les barriques neuves peuvent absorber du SO₂ libre dans les barriques (Chatonnet *et al.*, 1993 ; Coulter *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire d'ajuster régulièrement le SO₂ au cours de l'élevage. Il faut noter que des doses trop importantes en SO₂ peuvent altérer les propriétés organoleptiques du vin. Sa concentration dans les vins finis est soumise aux réglementations européennes. Aujourd'hui, une teneur maximale de 0,6mg/L de SO₂ actif est conseillée pour inhiber totalement la croissance de *Brettanomyces bruxellensis*, mais, comme nous l'avons vu précédemment, cette dose peut se révéler insuffisante pour certaines souches (Curtin *et al.*, 2012).

4.3.2.2 Autres méthodes

L'élimination physique des cellules de *B. bruxellensis* peut être réalisée par filtrations des vins (Millet et Lonvaud-Funel ; Calderon *et al.*, 2004 ; Duarte *et al.*, 2017). La filtration sur filtres de porosité inférieure à 0,45µm est recommandée (Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Calderon *et al.*, 2004). En effet, Millet et Lonvaud-Funel (2000) ont observé que les cellules à l'état VNC pouvaient passer à travers des filtres 0,45µm. Cette méthode peut être couplée à l'utilisation d'agents chimiques tels que le SO₂. Néanmoins, la filtration stérilisante peut modifier la structure colloïdale des vins et induire une perte de l'intensité colorante (Suárez *et al.*, 2007).

Des méthodes alternatives ou complémentaires utilisant des composés chimiques inhibiteurs peuvent être utilisées. Ainsi, l'ajout de 200mg/L de Diméthyl dicarbonate (DMDC) ou Velcorin (niveau maximum autorisé dans le vin) peut permettre de contrôler la croissance de *B. bruxellensis* pendant l'élevage dans les pays où son utilisation est autorisée (Delfini *et al.*, 2002 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2006 ; Renouf *et al.*, 2007). Les acides faibles tels que l'acide sorbique, benzoïque et fumarique peuvent avoir un effet sur *B. bruxellensis* (Rodriguez *et al.*, 2001). Néanmoins, leur utilisation dans les vins rencontre une résistance de la part des consommateurs (Pretorius, 2000 ; Suárez *et al.*, 2007) et concernant l'acide benzoïque, est interdite dans l'Union Européenne et par l'OIV. L'utilisation d'antioxydants tels que l'acide ascorbique (Suárez *et al.*, 2007) permet de réduire la présence de l'oxygène, inhibant de manière indirecte la croissance de *B. bruxellensis*. Le chitosan, polysaccharide dérivé de la chitine

permettrait également de diminuer la population de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin (Taillandier *et al.*, 2015 ; Elmaci *et al.*, 2015).

D'autres méthodes physiques telles que l'application de températures élevées (Fabrizio *et al.*, 2015), la pascalisation (application de hautes pressions) (Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2016) ou les ultrasons (Luo *et al.*, 2012) ont été mises au point. Néanmoins, ces méthodes sont souvent onéreuses, difficiles à mettre en place et ne garantissent pas toujours l'élimination totale de la population contaminante.

4.3.2.3 Élimination des phénols volatils

Le problème se pose lorsque les vinificateurs se rendent compte de la contamination lorsque les phénols volatils ont déjà été produits au-dessus du seuil de perception. Dans ce cas, même après élimination des populations contaminantes, les défauts organoleptiques associés aux phénols volatils persistent. Afin de résoudre ce problème, certaines techniques ont été développées afin d'éliminer ces molécules du vin. Elles sont notamment basées sur le principe de l'osmose inverse (Ugarte *et al.*, 2005) ou par addition de polymères de liant sélectivement aux PVs (Larcher *et al.*, 2012 ; Carrasco-Sánchez *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015). Néanmoins, ces méthodes nécessitent des validations plus poussées et ne résolvent pas le problème de la contamination en elle-même, puisque *B. bruxellensis* pourra se développer lors des millésimes suivants.

5 Problématique de thèse

La mise en évidence récente de la variabilité importante génétique au sein de l'espèce *B. bruxellensis*, et de l'existence de sous-populations triploïdes plus tolérantes aux sulfites et fréquemment isolées dans des régions viti-vinicoles en Australie (Curtin *et al.*, 2012) suscite de nombreuses questions :

- Quelle est la distribution de ces individus à l'échelle géographique ? temporelle ?
- Quelle est la prévalence des différentes sous-populations (triploïdes et diploïdes) dans les vins et régions viticoles du monde ? à l'échelle d'une région ? d'un chai ?
- Quels sont les flux de dispersion et comment s'est produite la dissémination ?
- A l'échelle du globe, existe-t-il différents points d'origine pour ces différents profils génétiques ?

Nous nous proposons dans le chapitre I, d'étudier la **diversité génétique** grâce à la collecte d'un nombre important d'isolats du **vin** dans différentes régions viti-vinicoles ou millésimes. L'utilisation d'**outils microsatellites** permettra de reconnaître les individus selon leur profil génétique et de leur niveau de ploïdie. La diversité et la **dispersion** des individus seront, en fonction de ce facteur, observées à différentes échelles **géographiques** ainsi qu'à **l'échelle temporelle** dans le vignoble bordelais.

Nous étudierons ensuite, dans le chapitre II, la **variabilité phénotypique** d'un échantillon représentatif de la diversité génétique observée. Le **métabolisme carboné** sera un axe de recherche privilégié pendant ces travaux, à côté de la tolérance à certains facteurs abiotiques (pH, éthanol, température, nature du vin). À travers les analyses menées nous essaierons de répondre aux questions :

- Le niveau de ploïdie et l'origine écologique des individus ont-ils une influence sur les profils de sucres utilisables par *B. bruxellensis* pour sa croissance ?
- Ont-ils une influence sur sa capacité à produire des PVs ?
- Quelle est l'influence de la ou des sources carbonées en présence sur le métabolisme de la souche ? Sur ses capacités de production en PVs ?

Nous replacerons ensuite l'étude des facteurs influençant son développement dans un **contexte œnologique**. Comme nous l'avons vu, *B. bruxellensis* peut être retrouvée à toutes les étapes de la vinification. Nous avons aussi souligné que l'influence de la **composition en sucres résiduels** des vins sur le développement de cette levure et l'altération des vins était mal connue.

En collaboration étroite avec différents châteaux du vignoble bordelais, nous explorerons donc dans le chapitre III les questionnements suivants :

- Peut-on identifier des profils de sucres typiques de certains vins de différents châteaux du vignoble bordelais ? Ce travail sera réalisé en fonction du stade de prélèvement.
- Existe-t-il un lien entre les profils et quantités établies, et l'altération ou le risque d'altération des vins ?

En lien avec les résultats présentés dans les trois premiers chapitres, nous compléterons certaines des problématiques par des travaux réalisés dans le vin au laboratoire, dans le chapitre IV, afin d'évaluer le risque d'altération associé à la fluctuation des températures dans les chais, et le risque spécifique lié à la présence de telle ou telle sous population dans les vins.

Matériel et Méthodes

1 Mode de collecte des échantillons de vin dans des châteaux du vignoble bordelais

1.1 Partenariat avec des châteaux du vignoble bordelais

Une collaboration étroite a été mise en place avec des châteaux du vignoble bordelais pour la réalisation de cette thèse. Ces châteaux, au nombre de 8 (A à H), sont situés sur différentes appellations de Bordeaux et de part et d'autre de la Garonne (Figure 10):

- Rive droite : Saint-Emilion (Châteaux A, B), Pomerol (Château H).
- Rive gauche (du Sud au Nord) : Pessac-Léognan (Château C), Margaux (Château F), Pauillac (Châteaux D, E et G).

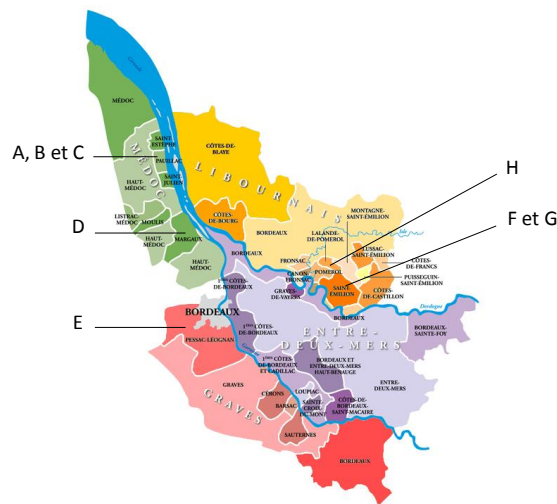


Figure 10 : Positions des 8 châteaux dans les différentes appellations du vignoble bordelais.

Le sol, l'emplacement, les cépages et les pratiques de vinification varient entre chacun de ces châteaux résultant en des vins uniques et typiques de chacun de ces domaines.

1.1.1 Objectifs

Ce partenariat nous a notamment permis de répondre à deux des objectifs de ce projet :

- **1 :** le premier était d'enrichir la collection du laboratoire d'individus de *Brettanomyces bruxellensis* isolés dans le vin. Pour cela, l'ensemble des châteaux a été invité à nous envoyer des échantillons de vins contaminés, provenant de plusieurs stades de vinification (fermentations, élevage et bouteille) et de plusieurs millésimes. Ce travail a été principalement réalisé sur les deux premières années de thèse (2014-2016).

- **2** : le second était de déterminer la composition en sucres résiduels et son évolution dans des vins rouges vinifiés en chai, lors des étapes les plus fréquemment associées à la contamination des vins par *Brettanomyces* (stades fermentaires et pendant l'élevage). Pour cela, deux modes de collecte ont été mis en place et seront décrits dans la partie 1.1.3 ci-après. Ce travail a été associé à l'isolement d'individus de l'espèce *B. bruxellensis* dans les échantillons collectés (n=1458 individus). Cela a considérablement contribué à l'enrichissement de la collection.

1.1.2 Conditions de prélèvement

Les prélèvements des échantillons, destinés à l'analyse microbiologique, ont été réalisés dans les meilleures conditions d'hygiène possible, afin de préserver l'échantillon de contaminations qui fausseraient le résultat. Pour cela, chaque château a utilisé des contenants stériles de 100 à 200mL, ouverts rapidement au moment du prélèvement. Les contenants ont été entièrement remplis afin de limiter le volume d'air disponible.

Aux stades fermentaires, les moûts et vins sont vinifiés dans des cuves en inox ou en bois de chêne. Les prélèvements des échantillons ont eu lieu au niveau du robinet de dégustation (situé au niveau de la partie basse de la cuve, donc sous le marc), préalablement désinfecté à l'aide de solutions sulfureuses puis purgé en laissant couler quelques litres de vin avant le prélèvement.

Pour les vins conservés dans les barriques, le prélèvement a été réalisé avec un plongeur (inox), désinfecté avec une solution sulfureuse, au niveau de la bonde, les barriques étant conservées bonde dessus. Les prélèvements ont tous été réalisés à mi-hauteur de la barrique.

Pour les vins en bouteille, après débouchage, une partie a rapidement été transférée dans un contenant stérile.

Une fois les échantillons prélevés, ils ont été amenés le plus rapidement possible au laboratoire. Lorsque les échantillons n'ont pu être amenés dans les heures suivant le prélèvement, ils ont été conservés à 4°C avant d'être envoyés.

1.1.3 Modes de collectes et traitement des échantillons

1.1.3.1 Objectif 1 : enrichissement de la collection

Aux stades fermentaires, les échantillons ont été prélevés en fin de fermentation alcoolique ou en fin de fermentation malolactique, dans des cuves pour lesquelles la présence de *B. bruxellensis* avait été détectée par PCR quantitative, lors des analyses menées par les châteaux. Dans le château G, pendant l'élevage du millésime 2013 en barrique, nous avons, pendant trois

mois, prélevé mensuellement (Octobre, Novembre et Décembre 2014), des vins élevés en barrique.

Lors d'opérations de rebouchage menées sur certains millésimes anciens (antérieurs à 1990) dans les châteaux E et F, les vinificateurs ont identifié des vins potentiellement altérés (couleur, analyse olfactive) et nous ont envoyé des échantillons pour analyse microbiologique.

En fonction du stade de vinification, les échantillons ont été traités suivant les protocoles d'isolement décrits dans la partie 2.3.1.

1.1.3.2 Objectif 2 : suivi de la composition en sucres résiduels de vin

Les échantillonnages ont été réalisés sur des vins de deux millésimes consécutifs (2014 et 2015) dans les 8 domaines viticoles (A à H). Le premier mode de collecte a été mené pendant les fermentations des vins rouges en cuve, le second pendant le premier été de l'élevage des vins rouges en barrique.

> Pendant les fermentations

En 2014, quatre châteaux (A, C, D et E) ont participé à la campagne de prélèvement. Pour chacun, deux lots de vins rouges issus de raisins de cépages différents (un de Merlot et un de Cabernet-Sauvignon) ont été échantillonnés. En 2015, les huit domaines viticoles (A à H) ont été échantillonnés, à raison d'un lot (Cabernet-Sauvignon ou Merlot) par château.

Un lot se rapporte à un vin. Chaque vin provient de raisins d'un seul cépage (CS : Cabernet-Sauvignon, Mt : Merlot). Chacun a été prélevé à deux stades. Le premier prélèvement a été réalisé à la fin de la fermentation alcoolique, avant l'égouttage. Puis le vin de goutte a été transféré dans une seconde cuve dans laquelle la FML a eu lieu. Les vins suivis n'ont pas subi d'assemblage avec un autre vin. Un second prélèvement a été réalisé à la fin de la fermentation malolactique, lorsque la totalité de l'acide malique a été transformée par les bactéries lactiques. Ce second prélèvement a été réalisé avant le sulfitage du vin ([Figure 11](#), page suivante). Au total, 32 échantillons ont été prélevés puis analysés. La [Figure 11](#) résume les campagnes de prélèvements réalisées au cours de ces deux millésimes.

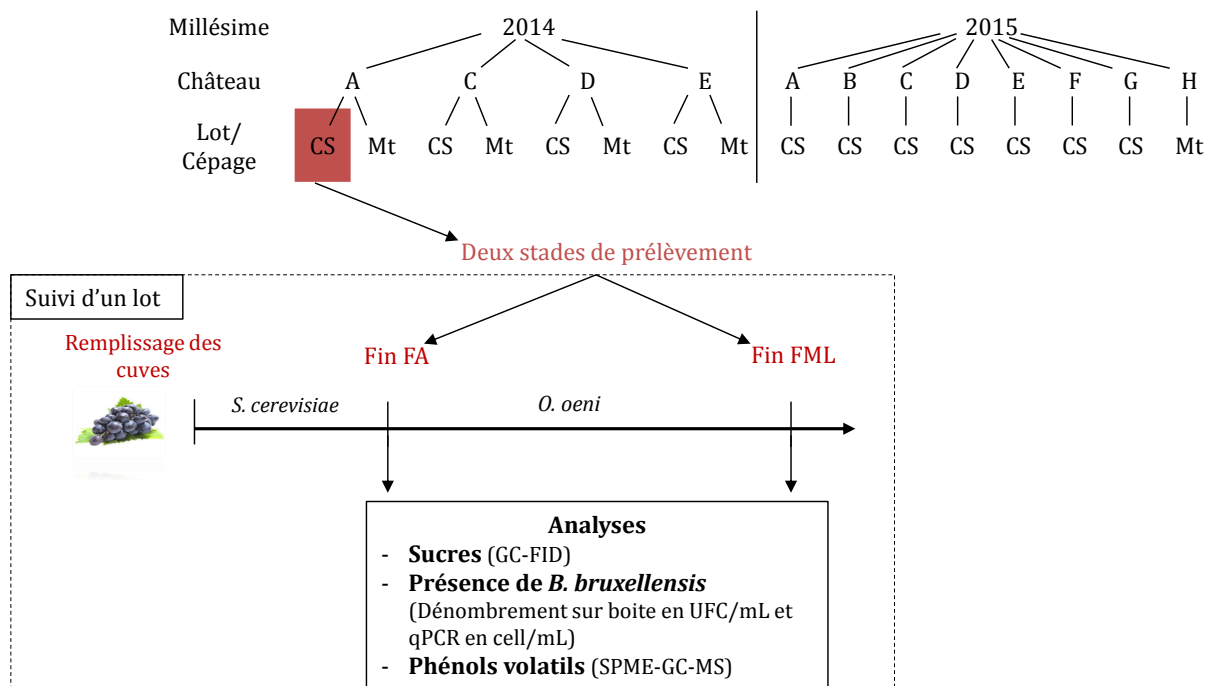


Figure 11 : Campagnes de prélèvements réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge en fermentation malolactique.

CS : Cabernet-Sauvignon, Mt : Merlot.

> Pendant l'élevage d'été

Les vins des millésimes 2014 et 2015, en élevage en barrique ont été prélevés pendant les étés 2015 et 2016 respectivement. Peu après la fin de la FML, les différents lots de vin obtenus peuvent, en fonction du choix du vinificateur, être mélangés à d'autres lots pour constituer des vins assemblés qui seront ensuite élevés en barrique pendant 12 à 18 mois. En conséquence, les lots suivis pendant l'élevage ne sont pas ceux que nous avons suivis lors des fermentations. Lors de l'entonnage, chaque vin assemblé est réparti dans plusieurs barriques. Afin d'obtenir une meilleure représentativité de la composition et de l'évolution en sucre d'un lot, 2 à 3 barriques ont été suivies pour chaque vin assemblé. Il est à noter que ces lots peuvent être mono cépage ou contenir des vins provenant de plusieurs cépages (Merlot, Cabernet-Sauvignon, Cabernet-Franc), en proportions différentes selon les châteaux.

Dans les châteaux considérés, après l'entonnage (ou mise en barriques réalisée entre Février et Avril), le vin est soutiré au début de l'été (entre Mai et Juillet), puis transféré dans une barrique propre et sulfitée (Soutirage S0). Il y reposera pendant 2 à 3 mois, avant d'être à nouveau transféré, lors d'un second soutirage (S1) dans une autre barrique, afin d'éliminer les lies ([Figure 12, page suivante](#)). A chaque soutirage, des mélanges de vins des différentes barriques d'un même lot peuvent avoir lieu. De ce fait, afin de limiter les interférences liées aux mélanges, pour chaque barrique suivie, nous avons récupéré un échantillon juste après le transfert du vin dans la barrique

propre (échantillon S0), puis un 2nd échantillon a été prélevé juste avant le transfert du vin dans une 2nd barrique (échantillon S1) lors du soutirage S1. La durée entre les deux prélèvements varie de 51 à 170 jours en fonction du lot et du château suivi, mais ne varie pas entre les barriques d'un même lot.

Au total, 7 châteaux ont été suivis lors de l'élevage du millésime 2014. Pour les châteaux A, B, E et F, 2 lots de vin ont été suivis. Dans les châteaux C, D et G, un seul lot a été échantillonné par château. En 2015, 7 châteaux ont également participé (A, B, C, E, F, G et H) à raison d'un lot par château. Au total, 52 barriques ont été suivies et 104 échantillons prélevés et analysés. La [Figure 12](#) résume les campagnes de prélèvement réalisées au cours de ces deux millésimes.

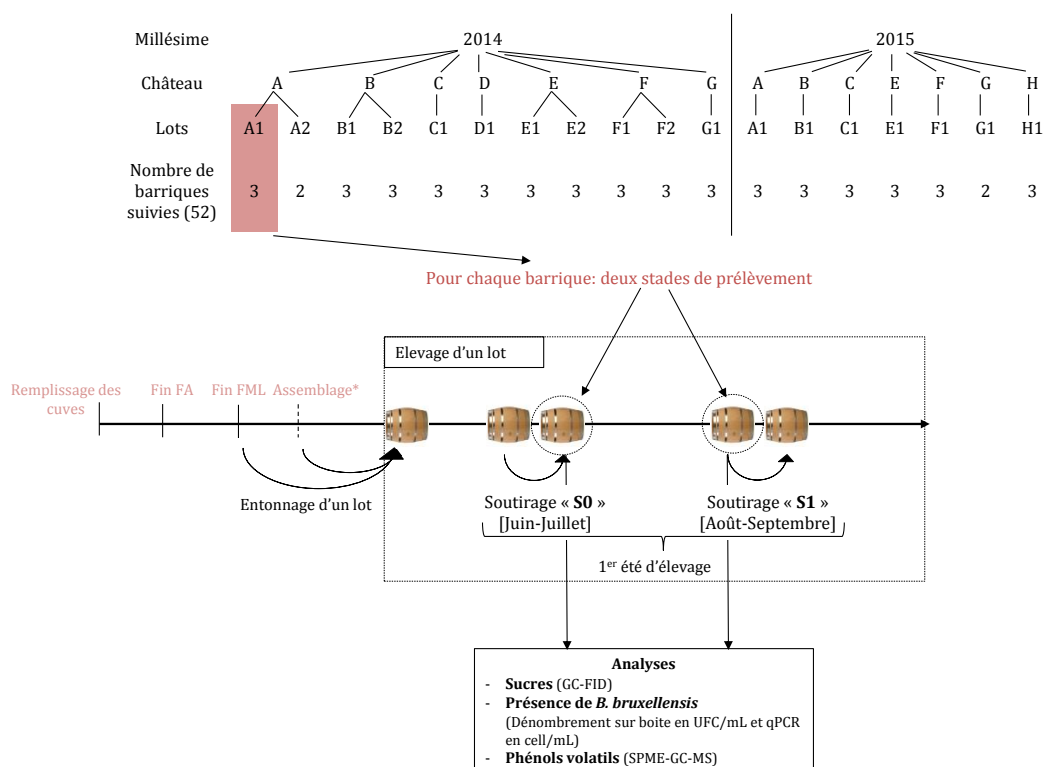


Figure 12 : Campagnes de prélèvement réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge lors du 1^{er} été d'élevage.

Chaque lot correspond à un vin réparti dans plusieurs barriques. Pour chaque vin, 2 à 3 barriques ont été suivies. Dans chaque barrique, un échantillon de vin a été prélevé après le 1^{er} soutirage d'été (S0) puis un second échantillon a été prélevé avant le transfert du vin lors du 2nd soutirage d'été (S1).

> Traitement des échantillons

Dans chacun des échantillons, la composition en sucres résiduels et la concentration en phénols volatils ont été analysées par les méthodes décrites dans les parties 6.6.1 et 6.2 respectivement. En fonction du stade de vinification, la population viable et cultivable de *B. bruxellensis* a été déterminée par dénombrements sur boîte comme décrit dans la partie 2.3.1. et la population totale a été mesurée par PCR quantitative comme décrit dans la partie 2.2.3.

2 Microbiologie

2.1 Milieux

2.1.1 Milieux liquides

> Milieu YPG

Pour les levures, le milieu de culture couramment utilisé pour entretenir les microorganismes est le **milieu YPG** (Yeast Peptone Glucose) : 20g/L de glucose, 10g/L d'extrait de levure et 10g/L de peptone. Le pH est ajusté à 5,0 avec de l'acide orthophosphorique avant stérilisation à l'autoclave (20min, 121°C, 1bar).

> Milieu Jus de Raisin

Le milieu de base de **Jus de Raisin** (JR) est un milieu riche utilisé pour les phases d'adaptation des levures au vin. Il contient 5 g/L d'extrait de levure, 1ml/L de Tween 80, 125ml/L de jus de raisin rouge commercial et le pH est ajusté à 3,5 puis stérilisé à l'autoclave.

> Milieu défini

Un milieu liquide défini, dit minimum, modifié à partir du milieu utilisé par Heresztyn (1986b) a été utilisé pour les expériences de phénotypage. Le milieu de base contient 2g/L de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 2g/L de phosphate de potassium monobasique KH_2PO_4 . En fonction de l'expérience considérée, une à plusieurs sources carbonées peuvent être ajoutées. Le pH est ajusté à 3,5 puis le milieu est stérilisé à l'autoclave avant d'être laissé à refroidir à température ambiante. Les vitamines et les oligoéléments, conservés à 4°C et l'abri de la lumière sont alors ajoutés à des concentrations finales dans le milieu de :

- 30µg/L de biotine, 1mg/L d'hydrochlorure de thiamine (Vitamines)
- 4mg/L de sulfate de manganèse dihydraté ($\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et de sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1mg/L de sulfate de cuivre hexahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), de iodure de potassium, de molybdate d'ammonium tétrahydraté ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et d'acide borique H_3BO_3 et 0,4mg/L de chlorure de cobalt hexahydraté ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Oligoéléments).

> Eau physiologique

Une solution d'eau physiologique a été utilisée pour conserver l'intégrité cellulaire. Elle correspond à la dissolution de 9g de NaCl par litre d'eau osmosée puis est stérilisée à l'autoclave avant utilisation.

2.1.2 Milieux solides

Le dénombrement et l'isolement des souches ont été réalisés sur milieu YPG gélosé (YPG + 20g/L d'agar).

Dans les échantillons de vin, l'énumération des populations cultivables de Non-*Saccharomyces* nécessite l'utilisation d'un milieu gélosé sélectif. Ainsi, le milieu YPG + 20g/L d'agar, après autoclavage, a été supplémenté avec 0,1g/L de chloramphénicol (anti-bactérien), 0,15g/L de biphényl (anti-fongique) et 0,5g/L de cycloheximide (inhibition de *S. cerevisiae*), *B. bruxellensis* étant l'espèce de levure du vin présentant les meilleures capacités de croissance à cette concentration sur milieu riche gélosé (Zott, 2008).

2.2 Dénombrements

2.2.1 Détermination de la population viable et cultivable

La population viable et cultivable est déterminée sur milieu gélosé YPG sélectif (échantillon de vin des châteaux) ou non. Les dénombrements sont réalisés par :

- filtration d'un volume d'échantillon sur membrane d'acétate de cellulose 0,2 μ m qui est ensuite déposée sur milieu gélosé.
- ou étalement d'un volume de 100 μ L de culture, diluée ou non, ou de vin avec des billes préalablement stérilisées.
- ou par dilutions décimales en série de la culture dans de l'eau physiologique. Pour chacune des 4 dilutions les plus fortes, 2 à 3 gouttes de 10 μ L chacune sont déposées sur milieu gélosé (Figure 13).

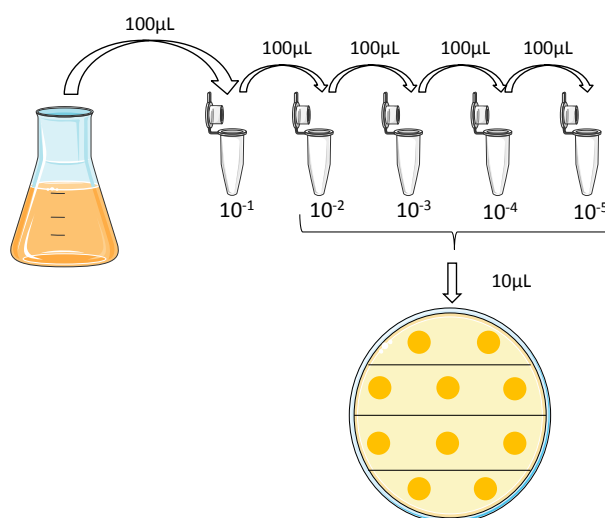


Figure 13 : Protocole de dénombrement par dilution sérielle et dépôt en goutte sur milieu gélosé.

Pour chaque échantillon, deux à trois dénombrements ont été réalisés. Les boîtes ont été incubées pendant 7 jours à 10 jours à 30°C. En l'absence de colonies après 3 semaines d'incubation, l'échantillon a été considéré négatif pour la présence de populations cultivables de *B. bruxellensis*. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par mL (UFC/mL).

2.2.2 Dénombrement sur cellule de Malassez

La cellule de Malassez est utilisée pour estimer le nombre de cellules dans une culture. Il s'agit d'une lame de verre dont la surface a été gravée d'un quadrillage de 25 rectangles contenant eux même 20 petits carrés. Vingt microlitres de culture sont placés entre lame et lamelle et les cellules présentes sont comptées sous microscope (x40). En fonction de la densité de population présente dans la préculture (estimée lors d'une première observation au microscope x40), la culture a été diluée au 1/2 - 1/5 avec de l'eau avant observation au microscope afin d'effectuer un comptage plus précis. Avant comptage, le milieu peut être mélangé volume à volume avec du bleu de méthylène (0,1g d bleu de méthylène par litre de tri-citrate de sodium dihydrate à 2% poids/vol), pendant 10min, afin de marquer en bleu les cellules mortes (Lange *et al.*, 1993). Au microscope optique (x40), le nombre de cellules vivantes est alors compté dans 9 rectangles (180 petits carrés). Afin de réaliser une lecture reproductible entre chaque carré, pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, seules celles chevauchant la ligne horizontale supérieure et la ligne verticale droite ont été comptées.

Le nombre de cellules dans la culture est alors calculé selon la formule :

$$N = \left(\frac{n}{V}\right) * f$$

N : nombre de cellules vivantes/mL
 n : nombre de cellules comptées
 V : volume de comptage en mL (9*10⁻⁵ mL)
 f : facteur de dilution

2.2.3 Détermination de la population par PCR quantitative

La population totale d'un échantillon de vin est analysée par PCR quantitative par le protocole développé par Bio-Rad (France) avec le kit VINEO *Brettanomytest*. La réalisation de cette PCR nécessite une étape préalable d'extraction de l'ADN avec le kit d'extraction VINEO Extract DNA. Les résultats sont exprimés en cell/mL.

2.3 Isolements et mise en collection

2.3.1 Isolement à partir des échantillons de vin

> Prélèvements pendant la vinification

Dès leur réception au laboratoire, les échantillons de vin ont été soumis aux protocoles de microbiologie conventionnelle, adaptés de Coulon *et al.* (2009).

Pour chaque échantillon présentant une population cultivable de *B. bruxellensis*, 10 à 15 individus ont été repiqués par étalement par épuisement une première fois sur milieu gélosé sélectif. Dans les cas de populations inférieures ou égales à 10 UFC, l'ensemble des individus ont été repiqués. Après incubation 7 jours à 30°C, pour chaque individu, une partie d'une colonie a été placée dans 50µL d'eau osmosée stérile dont 15µL ont été à nouveau étalés sur milieu gélosé pour produire de la biomasse. Les 35µL restants ont été placés à -20°C pendant un minimum de 12h. Ils ont été ensuite centrifugés à 3 000g pendant 2 min, puis repris dans 30µL de NaOH 20mM pour une meilleure lyse des cellules. Puis comme décrit en partie 3.3.1 et 3.2, pour chaque individu, une PCR TYPEBRETT a été réalisée afin de déterminer l'appartenance ou non de l'isolat à l'espèce *B. bruxellensis* ainsi que son niveau de ploïdie. Lors d'un résultat positif pour l'appartenance à l'espèce, le clone a été mis en collection comme décrit ci-après (Figure 14).

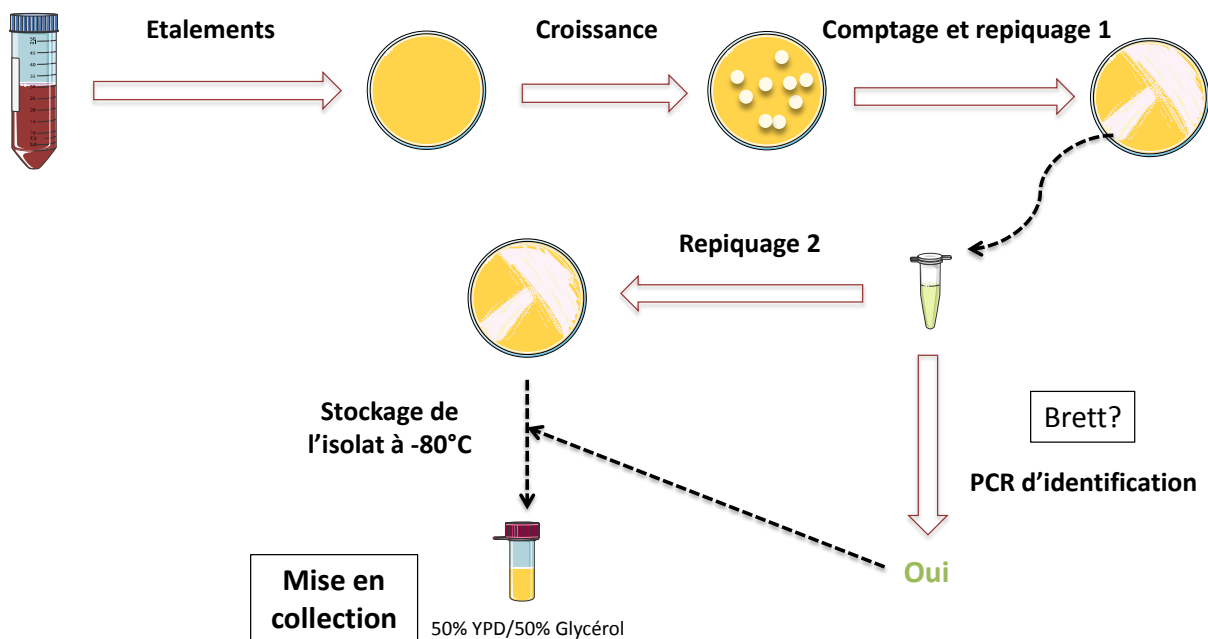


Figure 14 : Protocole de traitement des échantillons de vin prélevés pendant la vinification.

> Traitement des échantillons provenant de millésimes anciens

Dans le cas des échantillons provenant de millésimes anciens (<1990), nous avons appliqué un protocole différent :

- 50mL de vin ont été filtrés et déposés sur milieu gélosé sélectif ne contenant que 0,1g/L de cycloheximide, afin de stresser au minimum les cellules.
- 10mL de vin ont été supplémentés avec 1g/L de glucose et 1g/L de sulfate d'ammonium et incubé dans un tube sans agitation et sans apport d'oxygène pendant 7 jours. Par la suite, 100µL ont été étalés sur boîte et le reste a été filtré et déposé sur milieu gélosé sélectif contenant 0,1g/L de cycloheximide. L'objectif ici n'était pas de dénombrer la population, mais de permettre un meilleur développement des cellules présentes dans le vin afin de pouvoir les isoler.

La suite du protocole d'isolement est la même que ce qui a été décrit précédemment pour les échantillons prélevés pendant la vinification. Un résumé des isolats collectés en fonction des châteaux et des stades de prélèvement est présenté en Annexe 1.

> Mise en collection

Pour chaque isolat de l'espèce *B. bruxellensis* nouvellement collecté, un tube préalablement stérilisé contenant 50% de glycérol et 50% d'YPG a été ensemencé avec la biomasse générée sur milieu gélosé puis stocké à -80°C.

2.3.2 Isolement à partir de glycérol stock

Pour les différentes expériences de phénotypage, les individus ont été isolés à partir de la biomasse stockée à -80°C, sur milieu gélosé YPG et incubés pendant 7 à 10 jours à 30°C. Certaines souches n'ont pu être obtenues par ce biais-là et, dans ce cas, une étape préliminaire de mise en culture dans 10mL de YPG supplémenté avec de l'éthanol 5% v/v a été réalisée. Puis, 10µL ont été étalés sur milieu YPG gélosé. L'appartenance à l'espèce *B. bruxellensis* et le groupe génétique ont systématiquement été vérifiés pour chaque individu remis en culture, par PCR TYPEBRETT (partie 3.3.1 et 3.2), avant la réalisation des expériences de phénotypage.

2.4 Souches

2.4.1 La collection

La collection comprend 2210 isolats de vin. Isolés à différents stades de vinifications, ces individus proviennent de zones viti-vinicoles situées sur plusieurs continents (Afrique du Sud, Australie, Brésil, Europe, Etats-Unis d'Amérique) et de plusieurs régions pour certains pays (France et Italie). Un total de 630 isolats de vin a été collecté dans le cadre de la thèse de M. Avramova (2017) dont une partie a été fournie par des collaborateurs de laboratoires du monde entier. A ceux-ci s'ajoutent les 1458 individus isolés et collectés au cours de cette thèse dans 7 des 8 châteaux partenaires, aucun isolat n'ayant pu être isolé dans le château A (Annexe 1). Antérieurement à ces projets, 122 isolats de vin étaient déjà présents dans cette collection. L'ensemble de ces isolats a été typé par PCR TYPEBRETT, afin de vérifier leur appartenance à l'espèce *B. bruxellensis* et de déterminer leur groupe génétique.

2.4.2 La collection génotypée

Une partie de la collection (1318 isolats) a été génotypée par analyse PCR ciblant 12 marqueurs microsatellites (décrit dans la partie 3.3.4). Parmi les isolats de vins génotypés, 80% proviennent de France et 55% de la région de Bordeaux. Les isolats récents (>2010) de Bordeaux sont les plus fortement représentés parmi les isolats de vin étudiés (552/1318).

2.4.3 Les souches phénotypées

Parmi les souches de vin génotypées, un panel de 46 individus a été choisi pour réaliser les expériences de phénotypage. Ils proviennent de différents substrats (bière, bioéthanol, cidre, kombucha, téquila, vin) et au moins deux représentants de chacun des 6 groupes génétiques définis précédemment ont été inclus. L'ensemble de ces isolats n'a pas été phénotypé dans toutes les expériences de phénotypage réalisées. L'annexe 2 résume la matrice d'origine, le groupe génétique et les expériences auxquelles les individus sont associés.

3 Techniques de biologie moléculaire pour le typage génétique

3.1 Extraction d'ADN

Pour l'extraction d'ADN, une partie d'une colonie d'une culture fraîche sur milieu gélosé a été lysée dans 50µL d'une solution de NaOH 20mM, chauffée à 98°C pendant 5min. Un microlitre a ensuite été utilisé dans les réactions PCR.

3.2 PCR TYPEBRETT

La PCR TYPEBRETT a récemment été développée au laboratoire et le brevet est en cours de dépôt (N° soumission 1000371076). Elle permet de rapidement déterminer, d'une part, si un individu appartient à l'espèce *B. bruxellensis* et, d'autre part, son groupe génétique d'appartenance. Un microlitre d'extrait d'ADN (3.1.) a été utilisé pour réaliser la PCR. Elle nécessite deux couples d'amorces. Le premier (DB1, DB2) amplifie une séquence de 471 pb spécifique de l'espèce, dans le gène RAD4 de *B. bruxellensis*, mis en évidence par Ibéas (1996). Le second couple d'amorces amplifie une séquence spécifique du génome additionnel des individus triploïdes. Ainsi, dans le cas d'une souche diploïde, seule la bande à 471 pb est observée. Dans le cas d'une souche triploïde du groupe génétique AWRI1499-like, une seconde bande de 281 pb sera obtenue, et une bande de 356 pb pour les souches du groupe génétique AWRI1608-like (Figure 15).

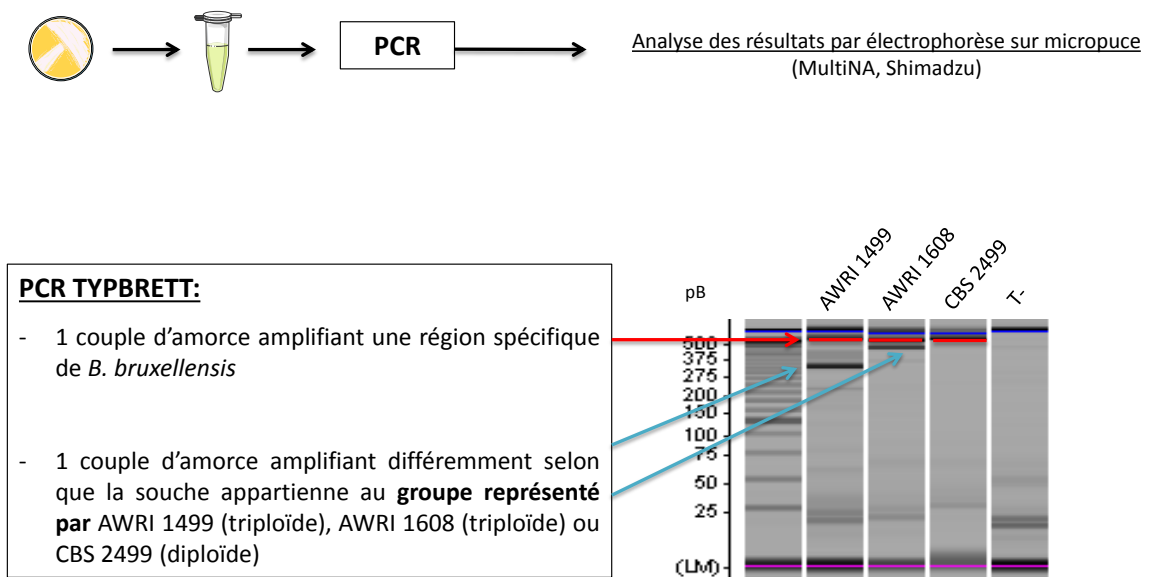


Figure 15 : Principe de la PCR TYPEBRETT.

La taille des fragments amplifiés a été analysée sur le système d'électrophorèse capillaire sur micropuce (MultiNA, Shimadzu) (décrit en 3.3). Préalablement à l'analyse électrophorétique, les échantillons ont été dilués 3 fois (10 μ L de produit PCR et 20 μ L d'eau distillée).

3.3 Electrophorèse capillaire sur micro-puce

Analysant régulièrement un nombre important de produits de PCR, nous avons utilisé le système MultiNA (Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis, Shimadzu) dont le principe est expliqué dans la thèse d'El Khoury (2014). Le principe de l'électrophorèse capillaire est le même que celui de l'électrophorèse classique : la migration des échantillons se fait dans un gel, avec un marqueur qui permet de détecter l'ADN. Chaque échantillon migre séparément dans un capillaire situé sur une micro-puce.

Le marqueur de poids moléculaire 25 bp DNA Ladder (Invitrogen) est déposé dans un tube séparé et migre une fois sur chaque puce, avant le passage des échantillons. Chaque échantillon migre à travers un capillaire dans un tampon de séparation (DNA 500, Shimadzu) grâce à un champ électrique élevé. Le tampon contient du SYBR Gold (Invitrogen), un fluorochrome, dilué 100 fois dans du Tris-EDTA pH 8, ainsi qu'un calibrateur contenant deux types de fragments, de faible et haut poids moléculaire, qui permettent de normaliser la migration. Lors de son passage au travers d'un système émetteur/détecteur à fluorescence, la lumière émise par la molécule marquée est mesurée puis transcrite sous forme d'un pic dans un électrophorégramme. Une image numérique d'un gel est également reconstituée et les fragments apparaissent sous forme de bandes. Le réglage des paramètres de l'analyse et le lancement de l'analyse se font grâce au logiciel «MultiNA Control». Les résultats sont enregistrés et peuvent être visualisés et analysés grâce au logiciel « MultiNA Viewer ».

3.4 PCR sur microsatellites

> Identification des loci et design des amorces

Les 12 séquences microsatellite choisies et les paires d'amorces conçues ont été déterminées sur la base de l'assemblage *de-novo* du génome de la souche triploïde AWRI1499 de *B. bruxellensis* (Annexe 3 : Avramova *et al.*, soumis, Supplementary Table S-2.1).

> Amplification

Afin de réduire le temps et le coût de l'analyse, certaines des réactions PCR ont été multiplexées (Annexe 3 : Avramova *et al.*, soumis, Supplementary Table S-2.1, colonne Tm). Le nombre de réactions PCR par échantillon est de 9. Les réactions PCR ont été réalisées dans un

volume final de 15µl, contenant 1µL d'ADN (3.1), 0,05 µM d'amorce sens, 0,5 µM d'amorce anti-sens, 0,5µM d'amorce M13 marquée, 1x Taq-&GO (MP Biomedicals, Illkirch, France). Les amorces sens possèdent, en 5', une séquence M13 comme décrit par Schuelke et al. (2000). Les amorces M13 universelles ont été couplées aux marqueurs fluorescents FAM, HEX, AT565 (équivalent à PET) ou AT550 (équivalent à NED) (Eurofins MWG Operon, Les Ulis, France). Cette méthode permet, avec une même amorce M13 couplée à un fluorochrome, de marquer plusieurs amorces microsatellite sens.

Le programme de la PCR Touch-Down consiste en une première étape de dénaturation de 1min à 94°C, suivie de 10 cycles de : 30s à 94°C, 30s à la température d'hybridation (T_m) + 10°C (puis diminution de 1°C par cycle jusqu'à atteindre le T_m) et 30s à 72°C, puis de 20 cycles de : 30s à 94°C, 30s au T_m et 30s à 72°C. Elle se termine par une étape de 2min à 72°C.

La taille des fragments amplifiés a été déterminée avec l'analyseur ABI3730 (Applied Biosystems), sur la plateforme génomique de l'INRA, UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes (33610 Cestas, France). Préalablement à l'analyse, pour chaque individu, les amplifias obtenus par les 9 PCRs ont été dilués (1800 fois pour FAM, 600 fois pour HEX, 1200 fois pour AT565 et 1800 fois pour AT550), puis multiplexés dans du formamide. Le marqueur moléculaire LIZ 600 (GeneScan 600 LIZ dye Size Standard, Applied Biosystems) a été dilué 100 fois et ajouté à chaque multiplex. Avant analyse, les amplicons dilués ont été chauffés 4min à 94°C. La taille des allèles a été déterminée manuellement, en utilisant la version d'essai du logiciel GeneMarker V2.2.0 (SoftGenetics).

4 Méthodes de caractérisation phénotypiques

Comme décrit dans la partie 2.4.3, chacune des 46 souches utilisées pour le phénotypage, a été isolée sur milieu gélosé YPG à partir du glycérol stock puis a été maintenue par repiquage régulier tous les 15 jours sur un milieu gélosé YPG.

4.1 Consommation des sucres en milieu modèle

4.1.1 Préculture des souches

Pour les différentes expériences de caractérisation phénotypique « sucres », une étape préliminaire d'adaptation des souches au milieu de culture a été réalisée. Le milieu de préculture correspond au milieu défini, supplémenté par 10g/L de glucose ou 10g/l de tréhalose, en fonction de l'expérience considérée, stérilisé avant l'ajout des vitamines et des oligoéléments comme décrit en partie 2.1.1.

Pour chaque souche, un volume de 100mL du milieu de préculture a été inoculé dans un erlenmeyer, d'un volume de travail de 250mL, stérile, bouché par du coton. En fonction des conditions d'aération de la culture, les conditions d'agitation de la préculture varient et seront précisées pour chaque expérience. Les précultures ont été incubées dans une chambre thermostatée à 25°C, pendant 72h. A 72h, la mesure de l'absorbance a été réalisée à 600nm.

Afin de ne pas apporter de source carbonée dans les milieux par le biais de la préculture, celle-ci a été centrifugée (3000 x g ,3min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot repris dans de l'eau physiologique, puis centrifugé une seconde fois. Le culot a alors été repris dans le milieu défini sans sucre et l'absorbance a été mesurée à 600nm. Le volume d'inoculation a été calculé afin d'obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1 dans les culturesensemencées.

4.1.2 Phénotypage en « nanofermenteur »

Nous avons testé la croissance des 46 souches choisies (Annexe 2) sur 16 sources carbonées : D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-galactose, D-ribose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, sorbitol, mannitol, cellobiose, lactose, maltose, tréhalose, mélibiose, saccharose. Le glucose a été utilisé comme source carbonée dans les précultures et celles-ci ont été maintenues sous agitation constante (barreau aimanté) à 200 rpm pendant 72h. Les cultures ont été réalisées en « nanofermenteur », des cuves de spectrophotométrie de 4mL, ce qui permet, sans prélèvement, de suivre l'évolution de la croissance de la population par suivi de la densité optique (600nm) au cours du temps. Les cuves ainsi que les bouchons ont été lavés à l'éthanol, puis stérilisés pendant 1h sous UV. Les barreaux aimantés ont été autoclavés séparément. Chaque cuve contenait 3mL de milieu : la base de milieu défini minimum, 10 g/L de source carbonée (sauf dans le témoin sans sucre), inoculé à 0,1uDO (à l'exception des témoins non inoculé). Un barreau aimanté, puis 300µL d'huile de silicone (Viscosité 500sDt à 25°C, Sigma-Aldrich) étaient ajoutés, afin d'homogénéiser et d'éviter l'évaporation du milieu. L'huile de silicone n'empêche pas le dégagement de CO₂ produit au cours de la fermentation, mais limite l'entrée d'oxygène dans le système. Un bouchon venait fermer la cuve. Il était percé par une aiguille hypodermique permettant le dégagement de CO₂ et était entouré de parafilm, afin de limiter les risques de contamination (Figure 16).



Figure 16 : Nanofermenteur (cuve de spectrophotométrie de 4mL).

Pour chaque souche, 17 cuves ont été inoculées : 1 cuve par source carbonée (16) et 1 cuve sans source carbonée (témoin négatif). Au vu de la lourdeur des manipulations et du peu de différences observées en termes de résultat entre les individus, l'expérience n'a été répétée que pour 8 des 46 souches en duplicata ou en triplicata. Au total, 9 séries indépendantes de 5 – 8 souches par séries ont été réalisées. Pour chaque souche, l'ensemble des modalités (17) a été suivi lors d'un même essai. Pour chacune des séries, 16 témoins non inoculés (un par sucre) ont été ajoutés, afin de vérifier l'absence de contamination des milieux. Au total, 1113 cultures ont été suivies.

La population a été suivie toutes les 24h par mesure de la turbidité à 600nm. A 30 jours de culture, les cultures ayant atteint la phase stationnaire (DO constante) ont été arrêtées. A 60 jours, toutes les cultures restantes ont été arrêtées, y compris celles qui n'ont pas présenté de croissance (DO constante à 0,10 environ).

A l'arrêt de la culture, le milieu de culture a été récupéré avec une seringue. L'appartenance à l'espèce et le groupe génétique ont été vérifiés (3.3.2). Le milieu a ensuite été conservé pour l'analyse des substrats et métabolites secondaires comme décrit en 4.1.7. La [Figure 17](#) résume les étapes de préparation et de suivis réalisées pour mener les expériences en « nanofermenteurs ».

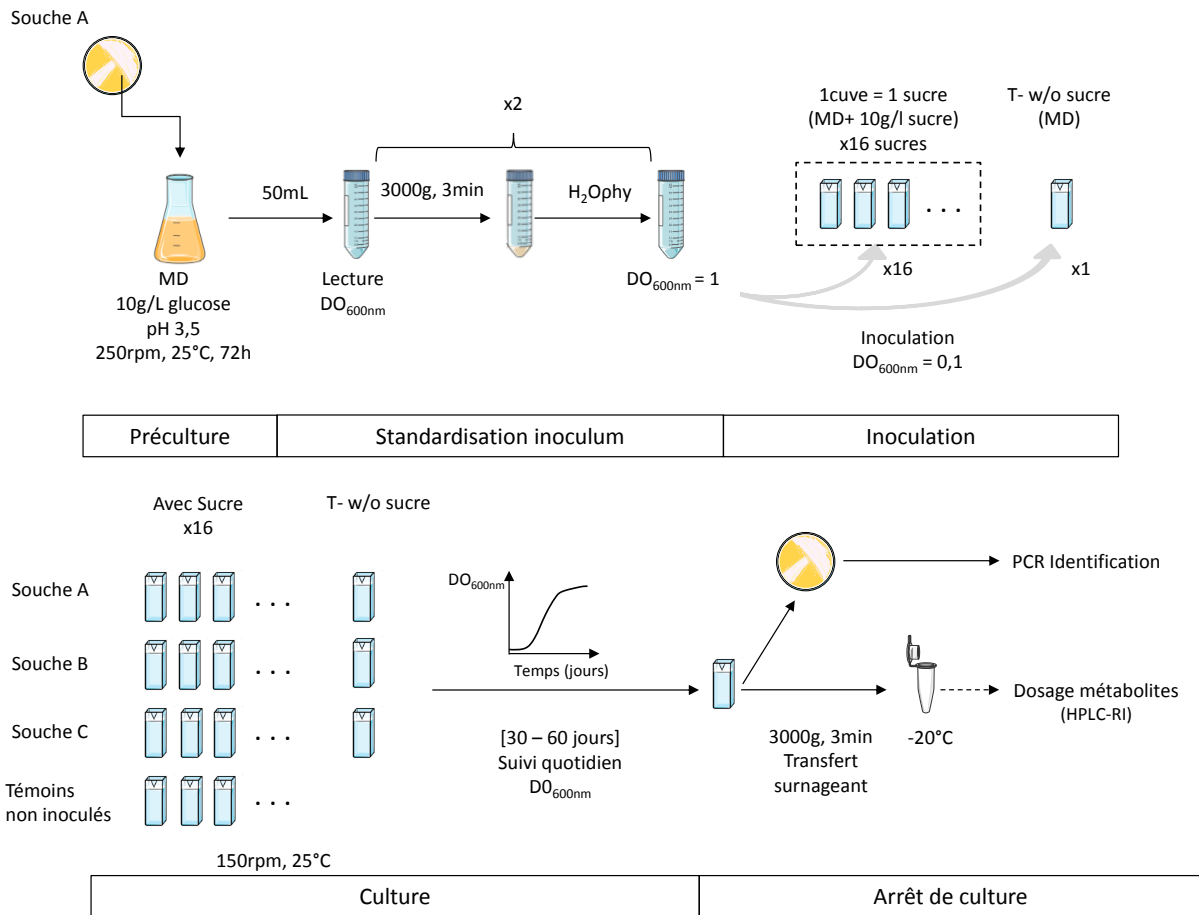


Figure 17 : Protocole pour le phénotypage en « nanofermenteur ».

MD= milieu défini, H₂Ophy : eau physiologique.

4.1.3 Etude des cinétiques de croissance en plus grands volumes

Une étude plus approfondie a été menée, afin d'observer les cinétiques de croissance, de consommation et de production de métabolites secondaires, en fonction de la source carbonée en présence. Pour cela, des cultures ont été réalisées et suivies pour deux souches, L0469 (diploïde, CBS2499-like) et L0424 (triploïde, AWRI1499-like), en présence de D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-galactose, D-ribose, cellobiose, maltose, saccharose et tréhalose. La préférence de *B. bruxellensis* pour certains substrats par rapport au glucose a également été étudiée lors de cultures en présence de glucose et d'une seconde source carbonée (fructose, mannose, galactose, tréhalose, maltose et cellobiose).

Pour les cultures sur une seule source de carbone, les précultures ont été réalisées avec 10g/L de glucose. Celui-ci a été remplacé par le tréhalose pour les cultures de mélange de sucres, afin de ne pas engendrer un phénomène de préférence au glucose associé à la répression catabolique. Les précultures ont été maintenues sous agitation constante à 250 rpm pendant 72h.

Lors des cultures sur une source de carbone unique, le milieu défini a été supplémenté avec 10g/L de la source carbonée et pour les cultures en mélange, avec 10g/L de glucose et 10g/L de la seconde source carbonée. Pour chaque souche, un témoin sans sucre a également été suivi. Les cultures ont été réalisées dans 250mL dans des flacons Schott de 500mL sous agitation (250 rpm pour garantir la suspension des cellules dans le milieu de culture) dans une chambre thermostatée à 25°C. Pour chaque sucre ou mélange de sucre, un témoin non inoculé a été inclus dans l'expérience.

Un volume de 1,5mL a été quotidiennement prélevé, afin de déterminer la densité optique et de doser les substrats et métabolites secondaires présents au cours du temps.

4.1.4 Production de phénols volatils sur différents substrats carbonés

Pour trois souches (parmi les 46), CBS2499 (diploïde), AWRI1608 (triploïde), L0424 (triploïde, AWRI1499-like), les capacités de production ont été évaluées en fonction de la source carbonée seule (glucose, fructose ou tréhalose) ou en mélange (glucose/fructose ou glucose/tréhalose). Chaque souche a été testée en duplicata biologique (préculture différente pour chaque réplicat). Les précultures ont été réalisées sur 10g/L de tréhalose, sous agitation (150 rpm), pendant 72h. Pour les cultures sur une seule source de carbone, le milieu défini a été supplémenté avec 10g/L de la source carbonée et pour les cultures en mélange, avec 5g/L de glucose et 5g/L de la seconde source carbonée. Dans ces milieux, ont été ajoutés 10mg/L d'acide *p*-coumarique. Pour chaque souche, un témoin sans sucre a également été suivi. Les cultures ont été réalisées dans 200mL dans des flacons Schott de 250mL sans agitation (sauf au moment du prélèvement, 5 minutes à 150 rpm), à 25°C. Pour chaque sucre ou mélange de sucre, un témoin non inoculé a été inclus dans l'expérience.

Des prélèvements quotidiens ont été réalisés afin de suivre la densité optique, la consommation en substrat et la production de métabolites (4.1.6 et 4.1.7). Pour chaque culture, la concentration en phénols volatils a été déterminée au début, pendant et en fin de phase de croissance par SPME-GC-MS (6.2).

4.1.5 Croissance sur différents substrats carbonés avec 12 ou 14% d'éthanol

Sur les mêmes souches, et sur les mêmes substrats et mélanges de substrats que précédemment, les capacités de production de PVs ont été évaluées en fonction de l'absence ou de la présence de 12 ou 14% d'éthanol (pureté > 99,9%). Ces cultures ont été réalisées en duplicata biologique.

Les cultures juste inoculées décrites dans le paragraphe précédent ont été réparties et placées dans des tubes de 13mL. Pour chaque source carbonée ou mélange considéré, le milieu a été supplémenté avec 0, 12 ou 14% d'éthanol. Les cultures en tubes ont été prélevées une première fois au moment de la phase de croissance dans les cellules aérées (mesure de l'absorbance et des sucres, voir 4.1.6 et 4.1.7). Puis, lors de l'arrêt de la culture, l'absorbance ainsi que les concentrations en sucres et en phénols volatils ont été déterminées.

4.1.6 Suivi de la croissance

En milieu modèle, l'évolution de la population totale a été suivie par mesure régulière de l'absorbance ou densité optique (estime la turbidité du milieu) à 600nm (DO_{600nm}). En « nanofermenteur », la culture ne peut être diluée et en conséquence, les valeurs de DO obtenues sont limitées par la limite de linéarité du spectrophotomètre (linéaire jusqu'à 1,5, absorbance maximale ~2). Dans les cultures en falcon ou en tube, la DO a été mesurée sur microplaque de 96 puits (Volume : 200 μ L). Des dilutions ont été réalisées avec de l'eau osmosée lorsque la mesure brute atteignait 1uDO.

4.1.7 Traitement des prélèvements

A chaque prélèvement, un millilitre a été centrifugé (3000 x g, 3min) et le surnageant récupéré et conservé à -20°C avant analyse des métabolites (substrats et produits du métabolisme: éthanol, acide acétique et acétaldéhyde) par HPLC-RI (décrit en 6.3).

Lors de la fin de suivi d'une culture, 10 μ L ont été étalés sur milieu gélosé, incubés 7 jours à 30°C, puis pour 3 colonies par souche et par culture, l'appartenance à l'espèce et le niveau de ploïdie ont été vérifiés par PCR TYPEBRETT (protocole en 3.2).

4.2 **Production de phénols volatils en milieu modèle**

Pour 33 souches (parmi les 46, voir [Annexe 2](#)), les capacités de croissance et de production de phénols volatils en milieu modèle ont été étudiées. Chaque souche a été testée en duplicata biologique (préculture différente pour chaque réplique). Après isolement sur milieu YPG gélosé à partir du glycérol stock (5-7 jours à 30°C), une colonie a été utilisée pour inoculer 12 mL de milieu défini supplémenté avec 5 g/L de glucose et 5 g/L de fructose (principaux sucres résiduels du vin) placé dans un tube stérile. Le tube a ensuite été incubé pendant 96h à 25°C, sans agitation. L'absorbance (600nm) a alors été mesurée.

Pour chaque souche et chaque réplique, un volume de 200 mL du même milieu que celui utilisé pour la préculture, supplémenté avec 20 mg/L d'acide *p*-coumarique et 20 mg/L d'acide

férule, a ensuite été inoculé à une DO_{600nm} de 0,1 à l'aide de la préculture. Les solutions mères de ces deux acides (50 g/L) ont été réalisées dans de l'éthanol (pureté > 99,9%), solvant nécessaire à leur dissolution et en conséquence, de faibles quantités en éthanol sont présentes en début de culture. Un flacon de vin témoin (T-) a également été préparé sans inoculation. Puis ces 200mL ont été répartis dans autant de tubes de 13 mL que de prélèvements envisagés pour le suivi de l'expérience. Les tubes ont été remplis en totalité afin de limiter l'espace de tête. Afin de ne pas agiter les cultures pour remettre en suspension au moment de prélever, un tube a été retiré du dispositif à chaque prélèvement. Deux modalités de suivi ont été retenues en fonction du nombre de prélèvements effectués au cours du temps. Pour 21 des 33 souches, un tube a été prélevé à 10, 20, 30, 45 et 60 jours de cultures. Pour 12 des 33 souches, un tube a été sacrifié à 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 et 60 jours, afin d'étudier la cinétique de croissance et de production de manière plus précise sur les premiers jours de culture.

Sur chaque tube prélevé, la DO_{600nm} a été mesurée et la population cultivable déterminée par étalement sur boîte (décrit en 2.2.1). De la même manière que décrit en 4.1.7, une partie de prélèvement a été stockée pour la mesure des substrats et métabolites secondaires. Le reste de la culture a été stocké à $-20^{\circ}C$ puis la quantité de phénols volatils présents y a été déterminée par SPME-GC-MS (protocole en 6.2). A 60 jours, l'appartenance à l'espèce et le niveau de ploïdie ont été vérifiés par PCR TYPEBRETT.

Un total de 68 cultures a été suivi (33 souches, 2 réplicats, 2 témoins non inoculés).

4.3 Phénotypage sur microplaques (système Biolog)

Huit souches (choisies parmi la liste des 46 souches phénotypées, [Tableau 6](#)) ont été phénotypées vis-à-vis de l'oxydation de 190 substrats carbonés sur deux microplaques de 96 puits (1 témoin sans sucre et 95 sources carbonées par plaque) commercialisées par Biolog (Phenotype Microarray PM1 et PM2, Biolog via Alliance Bio Expertise, France). Les sources carbonées, lyophilisées sont directement présentes dans chaque puit à des concentrations entre 2 et 20 mM. Le protocole utilisé a été adapté de celui décrit par Crauwels *et al.* (2015). Le principe repose sur la mesure de la réduction du tétrazolium (présent sous forme de sels) incolore, en formazan (violet), mettant en évidence la respiration cellulaire (Bochner *et al.*, 2001 ; Berridge *et al.*, 2005). L'accumulation de ces composés au cours du temps est mesurée par l'évolution de l'intensité colorimétrique.

Tableau 6 : Souches phénotypées sur microplaques PM1 et PM2 (Biolog)

Souche	Matrice d'origine	Groupe génétique (ploïdie)
L0611	Vin	CBS2499-like (2n)
L0422	Vin	
L14183	Vin	AWRI1608-like (3n)
GSP1516	Bière	
L14190	Vin	AWRI1499-like (3n)
L0424	Vin	
UWOPS 92-255.4	Tequila	CBS5512-like (3n)
CBS 3025	Bière	L14165-like (2n)

Après isolement des souches sur milieu YPG gélosé à partir des glycérols stocks (5-7 jours à 30°C), une colonie a été repiquée sur un nouveau milieu YPG gélosé (4 jours à 30°C). Le milieu a été centrifugé (3000 xg, 5 min, 4°C), puis repris dans un volume d'eau distillée suffisant pour obtenir une DO_{600nm} de 0,2. Contrairement à Crauwels et al. (2015), pour cette étape, nous n'avons pas utilisé le milieu NS proposé par Biolog (protocole pour *S. cerevisiae*), mais de l'eau distillée stérile, car ce milieu contient des acides aminés. En effet, d'après notre expérience, *Brettanomyces bruxellensis* peut utiliser certains acides aminés pour sa croissance comme seule source de carbone, et le milieu NS risquait d'induire des faux positifs.

Les plaques PM ont été inoculées avec 100µL d'un mélange contenant : 10 mL d'IFY-0 (1,2x, Biolog), 1 mL de la solution additive recommandée (12x), 160µL de l'indicateur coloré (sel de tétrazolium), 965 µL d'eau stérile distillée et 500 µL de l'inoculum. Chaque souche a été testée en duplicata biologique. Toutes les plaques ont été incubées pendant 8 jours à 25°C à l'abri de la lumière. De manière quotidienne, les plaques ont été analysées sur un lecteur de microplaque aux deux longueurs d'onde recommandées par le fournisseur. A la première longueur d'onde, l'appareil mesure l'absorbance due à la réduction de l'indicateur coloré ; avec la seconde, l'appareil mesure l'absorbance parasite (turbidité) qui est ensuite soustraite à la première mesure. Sur chaque plaque, un témoin négatif sans sucre a permis de vérifier qu'il n'y avait pas de réaction.

Pour une valeur supérieure à 1,2 fois la valeur obtenue sur le témoin négatif, le résultat a été considéré positif et, à l'inverse, comme négatif. En conséquence, une valeur binaire (0 : absence d'oxydation ; 1 : oxydation) a été attribuée à chaque puits. Pour les sources carbonées pour lesquelles le résultat variait entre les deux réplicats, aucune valeur n'a été attribuée (NA). L'intensité des changements colorimétriques associés aux tests positifs peut varier d'un facteur 10, en fonction du substrat et de la souche considérée. En conséquence, ce paramètre a également été pris en compte dans l'analyse des données (niveaux de vert).

4.4 Expériences réalisées dans le vin

4.4.1 Protocole d'acclimatation

Pour chaque souche, à partir d'une culture fraîche sur milieu gélosé, une colonie a été suspendue dans un tube de 13 mL contenant 9 mL de milieu Jus de raisin et 1 mL d'éthanol 100% (pureté > 99,9%). Les précultures ont été réalisées en triplicata biologique, c'est à dire ensemencées à partir de colonies différentes. Elles ont été incubées 6 jours à 25°C, sans agitation. A 6 jours, les populations viables ont été mesurées sur cellules de Malassez par le protocole décrit en 2.2.2. Les deux précultures présentant les populations les plus élevées ont été choisies pour l'inoculation des cultures.

4.4.2 Préparation des vins

Préalablement à l'inoculation, la part de SO₂ actif présent dans le vin a été éliminée par ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les vins ont ensuite été stérilisés par chauffage à 85°C pendant 30min, avec homogénéisation toutes les 5 minutes.

4.4.3 Suivi de la production de phénols volatils dans le vin

Les capacités de croissance, de consommation de substrats carbonés et de production de phénols volatils dans le vin ont été déterminées pour 9 souches de vin (Tableau 7).

Cette expérience a été réalisée dans deux vins A et B du millésime 2016, prélevés au cours de l'élevage dans les châteaux D et A respectivement. Leurs caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées par les laboratoires Oenoconseil (Pauillac) et Saint-Emilion Œnologie (St Emilion) (Tableau 8).

Tableau 7 : Souches caractérisées pour leurs capacités de croissance et de production dans le vin.

Souche	Groupe génétique (ploïdie)
CBS2499	
L0611	CBS2499-like (2n)
11AVB4	
L0422	
L14183	AWRI1608-like (3n)
GSP1516	
AWRI1499	
L14190	AWRI1499-like (3n)
L0424	

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des vins A et B.

	T.A.V. (% v/v)	pH	SO ₂ libre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)
Vin A	13,49	3,63	27	53
Vin B	14,3	3,48	30	54

À partir des précultures en milieu jus de raisin, les vins ont été inoculés à 10^3 cell/mL. Parallèlement, un flacon de vin témoin (T-) a été préparé sans inoculation. Pour chaque souche, les expériences ont été répétées sur deux répliquats biologiques, à partir de précultures indépendantes. Puis, chaque flacon a été réparti en 6 tubes de 13 mL (T1 à T6) incubés jusqu'à 6 semaines sans agitation. Chaque semaine, un tube a été sacrifié pour réaliser les mesures : population cultivable, concentration de phénols volatils, composition en sucres résiduels.

4.4.4 Effet de la température sur la croissance et la production de PVs dans le vin

Deux souches, L0424 (triploïde, AWRI1499-like) et L0611 (diploïde, CBS2499-like), isolées du vin ont été sélectionnées. Ces souches ont été mises en préculture en milieu jus de raisin selon le protocole décrit au paragraphe précédent puis placées dans le vin (précultures R1 et R2). Cette expérience a été réalisée dans un vin du millésime 2015, prélevé au cours de l'élevage en élevage dans le château F. Les caractéristiques physico-chimiques de ce vin ont été déterminées par le laboratoire SARCO : TAV 14,16%, pH 3,56, pas de SO₂ libre détecté.

Après mesure de la population viable, dans les précultures R1 et R2 (erlenmeyers sur la [Figure 18](#)), différentes dilutions ont été préparées dans le vin stérilisé pour obtenir les populations initiales souhaitées (flacons sur la [Figure 18](#)). La population initiale a été fixée à 10^2 UFC/mL, afin de mimer ce qui se passe en cours d'élevage : une population de 10^2 UFC/mL constitue, en effet, le seuil d'alerte communément admis dans les châteaux avec lesquels nous

avons travaillé. Néanmoins, pour compléter ce travail, l'effet du taux d'inoculation a été évalué à deux températures (14 et 18°C). Trois niveaux de population cultivable initiale ont été inoculés : 10, 10² et 10³ UFC/mL. Parallèlement, un flacon de vin témoin (T-) a été préparé, sans inoculation. Puis le contenu de chaque flacon a été réparti en autant de tubes de 13 mL que de prélèvements envisagés pour le suivi de l'expérience (Figure 19). Les tubes ont été remplis au maximum de leur capacité, afin de limiter l'espace de tête et les apports en oxygène. Les tubes ont ensuite été placés aux différentes températures étudiées : 12, 14, 16, 18 et 20°C.

Au total, 9 couples T°C/taux d'inoculation ont été étudiés. Comme indiqué dans la Figure 18, chaque association souche/T°C/taux d'inoculation a été testée en duplicata biologique, c'est-à-dire à partir de vins contaminés différents, R1 et R2.

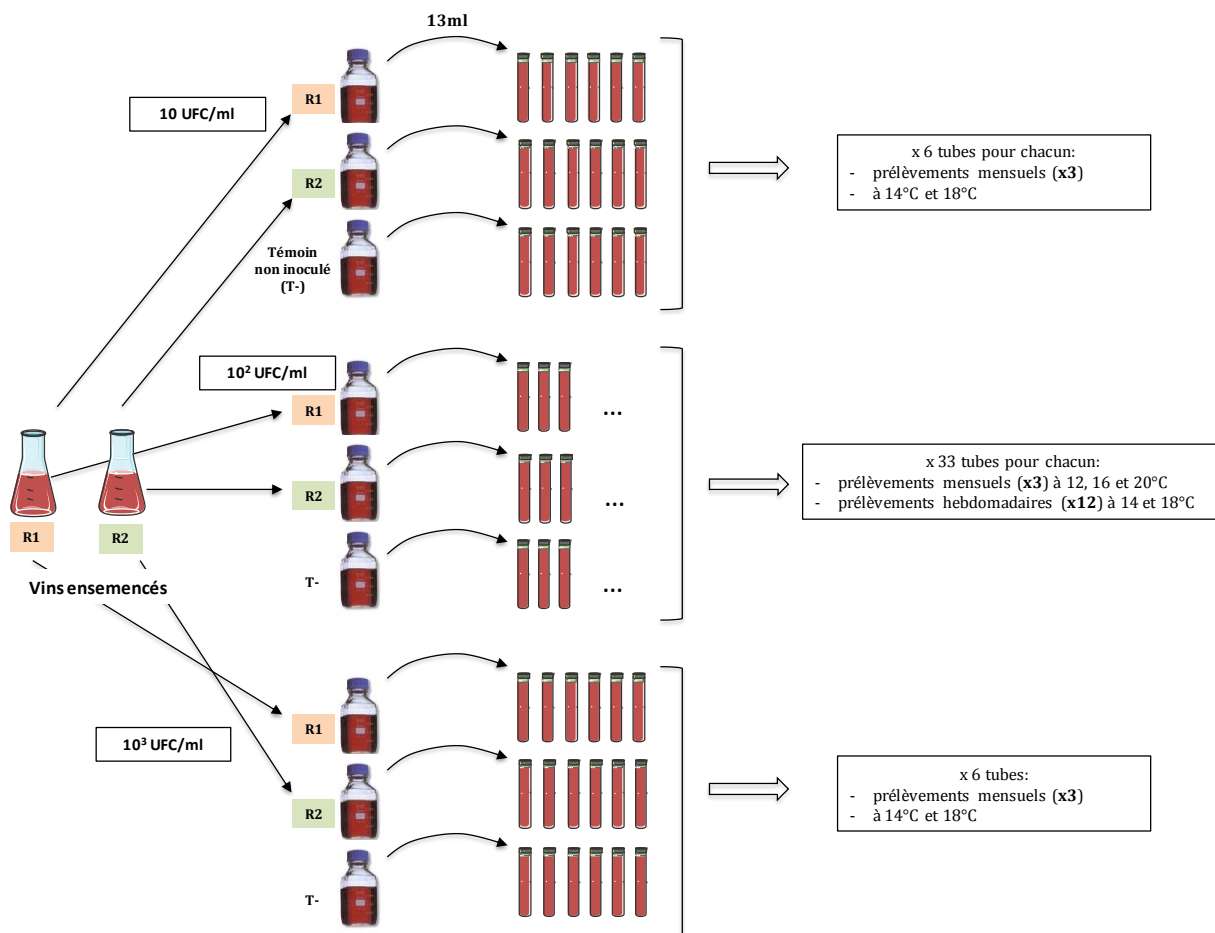


Figure 18 : Protocole d'inoculation et d'aliquotage des cultures pour les essais température.

R1 et R2 : répliquats 1 et 2, T- : témoin non ensemencé.

Pour le suivi, afin de ne pas agiter les cultures pour remettre en suspension au moment de prélever, un tube a été retiré du dispositif à chaque prélèvement. Deux modalités de suivi ont été retenues : **un suivi mensuel, noté A** pour lequel des échantillons de suivi ont été prélevés à 1, 2 et 3 mois. Les cultures inoculées à 10 et 10^3 UFC/mL ainsi que celles inoculées à 10^2 UFC/mL et incubées à 12 , 16 et 20°C ont été suivies tous les mois ; et **un suivi hebdomadaire, noté B**, pour lequel un tube a été prélevé tous les sept jours sur trois mois, soit 12 prélèvements au total pour chaque culture. Les cultures inoculées à 10^2 UFC/mL à 14 et 18°C ont ainsi été suivies toutes les semaines (voir récapitulatif dans le [Tableau 9](#)). L'expérience ayant duré 3 mois, le suivi mensuel a nécessité une série de 3 prélèvements. Pour le suivi hebdomadaire, 12 prélèvements successifs ont été réalisés (d'où le nombre de tubes indiqué sur la [Figure 18](#)).

Tableau 9 : Modalités de suivi des cultures en fonction de la température et du taux d'inoculation.

UFC/mL	12°C	14°C	16°C	18°C	20°C
10		A		A	
10^2	A	B	A	B	A
10^3		A		A	

Pour chaque tube prélevé, nous avons mesuré la population de *B. bruxellensis* par qPCR (cell/mL) et par étalement sur boîte (UFC/mL), et les concentrations de phénols volatils et de sucres résiduels ([Figure 19](#)).

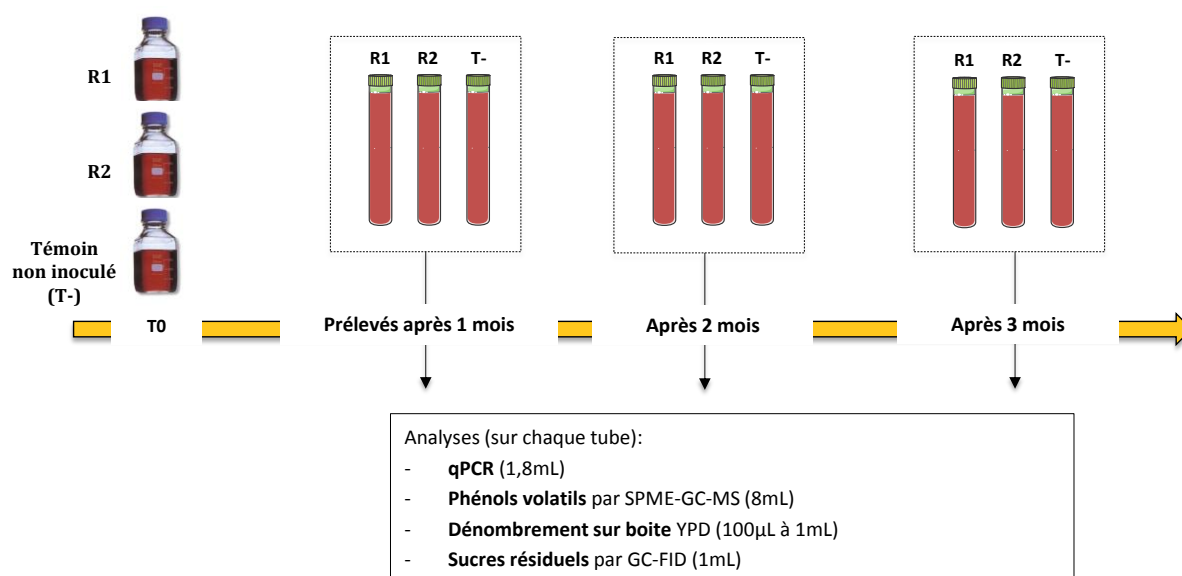


Figure 19 : Exemple de suivi et d'analyse pendant l'expérience 20°C pour une souche pour le suivi mensuel A.

5 Détermination des paramètres cinétiques de croissance

5.1 Profils de croissance

Dans ces cultures en milieu liquide, l'évolution de la population a été suivie par mesure de l'absorbance (DO_{600} , population totale), de la population cultivable (UFC/mL), ou de la population totale (cell/mL, qPCR). En fonction de la méthode de suivi de croissance utilisée (densité optique, population cultivable ou population totale), la biomasse présente à un instant t a été exprimée en uDO (population totale), en UFC/mL (population cultivable) ou en cell/mL (population totale).

La croissance microbienne observée traduit une augmentation en taille ou en nombre des micro-organismes. Dans une culture discontinue, le schéma de la croissance d'une population microbienne établi par Buchanan (1918) se décompose traditionnellement en sept phases distinctes, en fonction de la vitesse spécifique de croissance μ : phase de latence ($\mu=0$), phase d'accélération (augmentation du μ), phase de croissance exponentielle ($\mu=\mu_{\max}$), phase de ralentissement (diminution du μ), phase stationnaire ($\mu=0$), phase de début de décroissance ($\mu<0$) et phase de décroissance exponentielle, (Buchanan, 1918) (Figure 20).

La phase de latence correspond à une phase d'adaptation des cellules au nouvel environnement. Elle se caractérise par une absence de variation de la biomasse mesurée ($\Delta X=0$ où X est la biomasse) qui n'est pas nécessairement synonyme d'absence de croissance, mais plutôt de croissance très lente, et indétectable par les méthodes employées. Dans notre cas, la durée de cette phase a été déterminée entre le temps initial et le dernier prélèvement pour lequel $X = X_0$ (biomasse (t) = biomasse (t_0)).

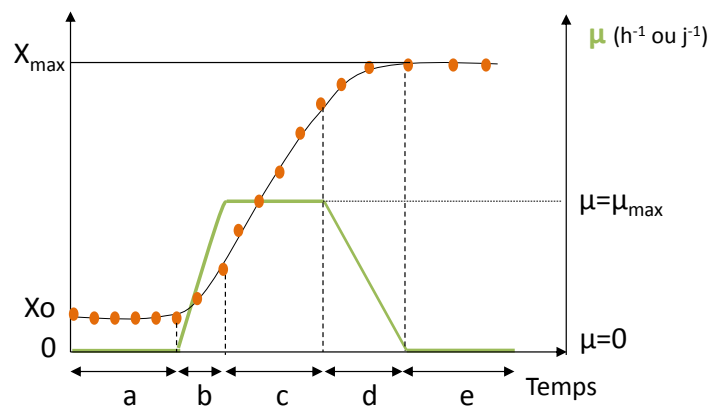


Figure 20: Profil de croissance microbienne et d'évolution de la vitesse de croissance spécifique μ au cours du temps dans une culture discontinue.

X = biomasse.

5.2 Calculs des paramètres de croissance

La **biomasse** accumulée en uDO a été définie comme :

$$\Delta X = X_t - X_0$$

où X_t et X_0 sont les absorbances mesurées aux instants t et $t=0$.

La mesure de la population cultivable permet de calculer l'intégrale de la biomasse accumulée sur un intervalle de temps. L'aire sous la courbe (Population cultivable = $f(\text{temps})$) a été calculée entre chaque point de prélèvement, par la méthode des trapèzes. La somme des aires calculées permet d'approximer la biomasse accumulée et active sur l'intervalle de temps (Figure 21).

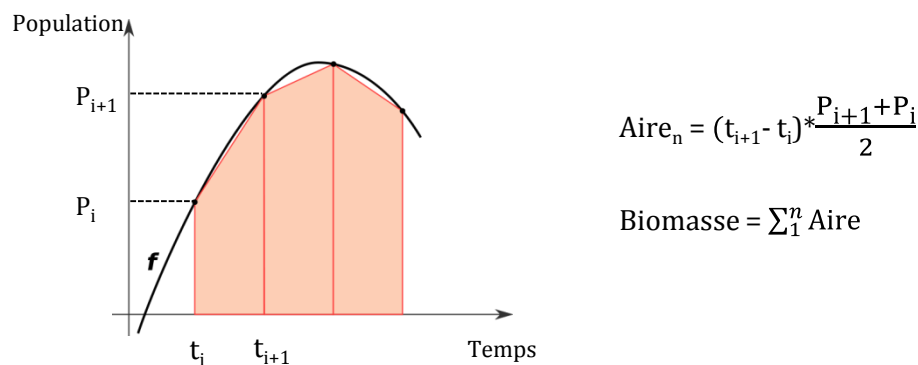


Figure 21 : Approximation de la biomasse produite par unité de temps par la méthode des trapèzes.

Modifié à partir de : https://fr.wikipedia.org/wiki/Calcul_num%C3%A9rique_d%27une_int%C3%A9grale

Pour calculer les vitesses spécifiques de croissance ou de consommation de substrat instantanées, nous avons utilisé des courbes de croissance lissées manuellement et qui seront à chaque fois représentées à côté des données expérimentales.

La **vitesse spécifique de croissance**, μ (h^{-1} ou jours^{-1}) a été définie comme :

$$\mu = \frac{\ln(X_{t+1}/X_{t-1})}{(t+1)-(t-1)}$$

où X_{t+1} et X_{t-1} sont les absorbances mesurées aux instants $t+1$ et $t-1$.

où μ_{\max} correspond à la vitesse spécifique maximale de croissance, exprimée en heure ou jours.

La **vitesse spécifique de consommation de substrat**, q_s a été définie comme :

$$q_s = \frac{S_{t+1} - S_{t-1}}{X(t) * ((t+1) - (t-1))}$$

où X est la concentration cellulaire au temps t , S_{t+1} et S_{t-1} sont les concentrations de substrat mesurées à l'instant $t+1$ et $t-1$ respectivement (en g/L ou en M) ; q_s est généralement exprimée en $\text{mM}/\text{j}/\text{uDO}$.

$q_{s\max}$ correspond à la vitesse spécifique maximale de consommation de substrat.

La **vitesse spécifique de production (phénols volatils) q_p** a été définie comme :

$$q_p = \frac{P_{t+1} - P_{t-1}}{(X(t) * (t+1) - (t-1))}$$

où X est la concentration cellulaire au temps t, P_{t+1} et P_{t-1} sont les concentrations de produit mesurées à l'instant t+1 et t-1 respectivement (en $\mu\text{g/L}$). q_p est exprimée en $\mu\text{g/L/j/uDO}$ ou en $\mu\text{g/L/j/UFC}$.

La **vitesse de production r_p** a été définie comme ($\mu\text{g/L/j}$) :

$$r_p = \frac{P_t}{(t - t_0)}$$

où P_t est la concentration en produit formé au temps t et t_0 correspond au temps du prélèvement précédent l'apparition du produit.

Le **rendement $Y_{X/S}$** en biomasse par rapport au sucre consommé a été défini comme :

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

X_f est généralement défini comme la biomasse présente lorsque le substrat a été totalement consommé ou lors de l'arrêt de la culture. S_0 correspond à la quantité initiale de sucre et S_f à la quantité finale (égal à 0 s'il a été totalement consommé).

Le **rendement $Y_{P/S}$** en produit (éthanol, acide acétique ou acétaldéhyde) ou ratio par rapport au sucre a été défini comme :

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

P_f est généralement défini comme la quantité de produit présent lorsque le substrat a été totalement consommé.

Lors des suivis dans le vin, les données expérimentales de populations cultivables ont été ajustées avec le modèle logistique qui permet d'estimer K et r.

$$N_t = \frac{K * N_0 * e^{rt}}{C_{max} + N_0 * (e^{rt} - 1)}$$

où N_t est la population cultivable au temps t (UFC/mL), K représente la population maximale (UFC/mL), N_0 représente la population initiale (UFC/mL) et r, la vitesse de croissance (nombre de division par heure) (Albertin et coll., 2011).

6 Méthodes d'analyse chimique

6.1 Dosage des sucres résiduels dans le vin par GC-FID

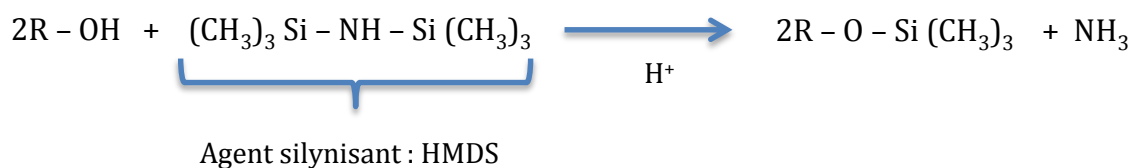
L'objectif était de doser les sucres résiduels entrant dans la composition du vin et susceptibles d'être utilisés par *Brettanomyces bruxellensis* (Tableau 10). Dans un souci de simplification, il sera admis dans la suite du manuscrit que le terme générique de « sucres dans le vin » se réfère aux sucres ainsi qu'aux deux polyalcools.

Tableau 10: Sucres dosés dans le vin par GC-FID

Pentoses	Arabinose, rhamnose, ribose, xylose
Hexoses	Glucose, fructose, mannose, galactose
Disaccharides	Lactose, maltose, cellobiose, tréhalose, mélibiose
Trisaccharide	Raffinose
Polyol	Mannitol, sorbitol

GC-FID : chromatographie en phase couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

La séparation des substances thermiquement peu stables et peu volatiles telles que les hydrates de carbone par une chromatographie en phase gazeuse nécessite une étape préliminaire de **silylation**. Elle permet de remplacer les hydrogènes labiles, liés à l'oxygène, par un groupement triméthylsilyle (TMS)-Si(CH₃)₃, non susceptible de former des liaisons hydrogène avec les autres molécules. Cela permet alors d'augmenter la volatilité ainsi que la stabilité thermique de la molécule silylée. La réaction sur les sucres, consiste en une substitution sur la fonction alcool avec formation d'un éther.



L'agent silylant utilisé est l'**hexaméthylidisilazane** (HMDS) (Sweeley *et al.*, 1963). Une molécule d'HMDS permet la modification de deux groupements alcools et la formation d'une molécule de NH₄. La réaction doit s'effectuer en absence d'eau car l'HMDS est décomposé en présence d'eau en hexaméthylidisiloxane, inerte vis à vis des solutés. Avant la silylation, les échantillons sont tout d'abord **lyophilisés**, puis repris dans un solvant inerte vis-à-vis de l'agent de silylation. La **pyridine** est l'un des principaux solvants utilisés et permet en outre de favoriser la réaction en se comportant comme accepteur de protons.

Les conditions de préparation des échantillons ont été les suivantes : dix microlitres de pentaérythritol (30g/L dilués dans de l'eau) ont été ajoutés à 1mL d'échantillon dans des tubes Pyrex de 13mL, fermés avec un morceau de parafilm et placés pendant 12h à 24h à -20°C. Une fois congelés, les échantillons ont été lyophilisés pendant 24 à 48h. Les tubes ont alors été fermés avec un bouchon contenant une membrane de PTFE/Ethylène propylène. Les réactifs ont ensuite été ajoutés aux échantillons lyophilisés dans l'ordre suivant : 0,2 mL de pyridine (solvant), 0,7 mL d'hexaméthylcyclotriasiloxane HMS (agent de silylation), 0,1mL d'acide trifluoroacétique (catalyseur). La dissolution a été réalisée pendant 5min dans un sonicateur (Ultrasonic cleaner x Volt, VWR) puis les échantillons ont été chauffés pendant 3h à 80°C, afin d'augmenter la vitesse de la réaction et de s'assurer de la réaction totale. Ils ont ensuite été refroidis pendant 1h à température ambiante avant injection. La dérivation d'un nombre trop important d'échantillons à la fois entraîne des temps d'attentes importants avant injection et la détérioration de certains échantillons (Villas-Bôas, 2007). Afin d'éviter cela, la silylation a été réalisée sur des lots de 8 échantillons au maximum directement analysés en GC-FID après dérivation.

Après silylation, les sucres résiduels (oses, disaccharides et polyols, voir [tableau 10](#)) du vin ont donc été quantifiés par **GC-FID**, comme décrit dans la thèse de Rosella Triquet-Pissard (1979). La méthode a été modifiée et adaptée dans la préparation de l'échantillon et dans les conditions chromatographiques. Le **penta-érythritol** a été utilisé comme étalon interne.

Les conditions de chromatographie ont été les suivantes :

Le chromatographe utilisé était un HP 6890 (Agilent Tech.), équipé d'un passeur d'échantillon automatique 7683B Series Injector (Agilent Tech) et couplé à un détecteur à ionisation de flamme. Les conditions de séparation et de détection sont présentées dans le [Tableau 11](#).

L'analyse de solutions de référence, dans l'eau puis dans le vin, contenant chaque composé à une concentration de 200mg/L a permis de déterminer les temps de rétention. Puis, pour chaque sucre, des mesures de répétabilité (eau et vin, 200mg/L pour chaque sucre, 10 répétitions), de linéarité (eau et vin) ainsi que les limites de détection et de quantification dans le vin ont été réalisées (résultats présentés en [annexe 4](#)). Afin de vérifier que les concentrations obtenues dans les échantillons n'étaient pas sujettes à variation selon le vin étudié, nous avons, dans plusieurs vins, réalisé des ajouts dosés.

Tableau 11 : Conditions d'analyse pour le dosage des sucres résiduels dans les vins rouges par GC-FID.

Injection	Volume d'injection : 1µL, en mode splitless, temps de purge : 0,50min
Colonne de chromatographie	CP-Sil 5 CB, 50m x 0,32mm de dimension interne, 0,1µm d'épaisseur de film (Agilent Tech.)
Gaz vecteur	Hydrogène, débit de 30mL/min
Programme de température	température initiale de 120°C, augmentée de 1°C/min jusqu'à 165°C puis de 12°C/min jusqu'à 217°C, de 3°C/min jusqu'à 265°C puis de 10°C/min jusqu'à 295°C, maintenue pendant 5min.
Pression en tête de colonne	18,07psi

La quantification a été réalisée en établissant un rapport entre l'aire du pic correspondant à chaque sucre avec celui de l'étalon interne. Les sucres peuvent présenter plusieurs formes isomériques dans un même échantillon et, dans ce cas, plusieurs pics (avec des temps de rétention parfois éloignés) ont été obtenus et intégrés (Molnar-Perl, 2000). Pour chacun des sucres analysés, les temps de rétention sont résumés dans le [Tableau 12](#). Il n'a pas été possible, avec cette méthode, de distinguer glucose et fructose et ces deux composés ont donc été dosés ensemble (glucose+ fructose).

Tableau 12 : Temps de rétention des sucres analysés par GC-FID dans le vin

Analytes	Temps de rétention (min)
L-Arabinose	11,11 ; 12,30
D-Ribose	12,636 ; 13,051
L-Rhamnose	14,577
D-Xylose	15,287 ; 18,773
D-Glucose + D-Fructose	23,1 ; 28,115 ; 37,172
D-Galactose	24,48 ; 26,47 ; 29,75
D-Mannose	29,37
Sorbitol	33,194
Mannitol	32,71
Lactose	57,41 ; 59,94
Maltose	58,24 ; 59,17
Trehalose	59,2
Cellobiose	58,43 ; 60,56
Mélibiose	61,68 ; 62,16
Raffinose	70,61

6.2 Mesure de la concentration de phénols volatils

Les phénols volatils ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse associée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS), et couplée à une extraction par **SPME** par la méthode décrite par Romano *et al.* (2008). Du 4-éthylphénol deutéré (100µg/L) a été ajouté comme étalon interne.

Les conditions de préparation des échantillons sont les suivantes :

Pour les dosages des concentrations produites en milieu défini, les échantillons ont été dilués, afin que les quantités analysées soient dans les limites des gammes de linéarité (en milieu défini : 1-2000µg/L pour le 4EP et 1-1000µg/L pour le 4EG et les vinyls phénols, $R^2 > 0,99$). Les vins analysés n'ont pas été dilués (linéarité entre 1 et 1000µg/L pour le 4EP et 1-500µg/L pour les autres phénols volatils, $R^2 > 0,99$). Dix millilitres de vin ou de milieu éventuellement dilués sont placés dans un flacon pour SPME, préalablement rempli avec 3,5g de NaCl. Cent microlitres de la solution interne (4-éthylphénol deutéré, 35mg/L en solution alcoolique 100%) sont ajoutés. Le flacon est serti avec une capsule métallique recouverte d'un septum en caoutchouc téfloné, puis agité au vortex. Les conditions d'extraction sont détaillées dans le Tableau 13.

Les conditions chromatographiques retenues sont : passeur d'échantillon automatique Gerstel MPS2 chromatographe HP 689 (Agilent Tech.), couplé à un spectromètre de masse quadripolaire HP 5973 (Agilent Tech.). Les conditions de séparation et de détection sont présentées dans le Tableau 13. La détection et la quantification des composés ont été réalisées en mode SIM. Les ions utilisés ainsi que les temps de rétention de chaque molécule dosée sont présentés en Tableau 14. Pour chaque molécule, la quantification a été réalisée à partir des coefficients de réponse (rapport entre l'aire des pics des ions spécifiques de chaque molécule avec celui de l'étalon interne) déterminés à partir des gammes de linéarités réalisées dans chacune des matrices (vin et milieu défini).

Tableau 13 : Conditions d'extraction et d'analyse pour le dosage des phénols volatils par SPME-GC-MS.

Adsorption	Fibre utilisée en polyacrylate d'épaisseur de film 85µm (Supelco, Etats-Unis) Adsorption à 50°C pendant 30min sous agitation.
Désorption et injection	Température de l'injecteur : 250°C Désorption pendant 5min ; injecteur en mode splitless
Colonne de chromatographie	HP-5 30m x 0,25mm de dimension interne, 0,25µm d'épaisseur de film (Agilent)
Gaz vecteur	Hélium à 1 mL/min
Programme de température	60°C pendant 10min, puis une 1 ^{ère} rampe à 3°C/min jusqu'à 125°C, suivi d'une seconde de 5°C/min jusqu'à 220°C, maintenue pendant 10min.
Pression en tête de colonne	8,2 psi

SPME-GC-MS : microextraction sur phase solide couplée à la séparation des composés par chromatographie en phase gazeuse et à la détection par spectrométrie de masse.

Tableau 14 : Temps de rétention et ions de référence des 5 molécules analysées par SPME-GC-MS.

Analyte	Temps de rétention (min)	Ions de quantification (m/z)
4-éthylphénol deutéré	13,367	113
4-éthylphénol	13,587	107
4-éthylguaicol	18,145	137
4-vinylphénol	15,72	120
4-vinylguaicol	19,611	150

6.3 Dosage de substrats par chromatographie liquide (HPLC)

Dans les échantillons prélevés en milieu modèle, les sucres et les métabolites secondaires présents ont été quantifiés en chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection par réfractométrie (HPLC-RI) à l'aide d'un chromatographe Waters, équipé d'un système de dégazage en ligne, d'une pompe (Waters 515 Controler), d'un passeur d'échantillons automatique (Waters 2707 Auto sampler), d'un réfractomètre (Waters 2414 refractive Index Detector) ainsi que d'un four (Waters). Le traitement des données et la gérance de l'appareil ont été effectués par le logiciel Empower Software également conçu par la société Waters. La séparation des composés a été réalisée sur une colonne échangeuse d'ion Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm), maintenue à 65°C. Vingt microlitres d'échantillon ont été injectés, l'éluant étant l'acide sulfurique 5mM, passant à un débit de 0,5mL/min. La durée de l'analyse était de 30 min.

7 Mise en place des capteurs au chai

Des capteurs mesurant la température et l'hygrométrie (Vérigo, France) ont été installés dans les chais de trois châteaux (Châteaux A, E et F). Au total, nous avons placé 33 capteurs, de manière à obtenir une image représentative de l'ensemble des températures des chais. Par ailleurs, certains de ces capteurs ont été positionnés à des endroits stratégiques, pouvant présenter des variations de température singulières, c'est-à-dire près des portes d'accès au chai, dans des zones de passage ou à proximité des centres d'opérations de nettoyage des barriques. Les capteurs ont été positionnés à hauteur du 1^{er} rang de barrique (1^{ère} carafe), soit environ 1m dans tous les châteaux. Les températures ont été relevées toutes les 15 min.

8 Traitement des données et analyse statistique

Les données microsatellite ont été traitées en utilisant le package Poppr de R (version 3.1.3, <https://www.r-project.org>). Le dendrogramme a été établi en utilisant la distance de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004) et la méthode d'agrégation du Neighbour Joining (Paradis *et al.*, 2004). La visualisation des données ainsi qu'une part importante des figures ont été réalisées grâce aux différents packages du logiciel R. Une partie des figures (courbes de croissance, chapitre 2), ont été réalisées avec le logiciel SigmaPlot V13.0 (Systat Software Inc.). Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'interface graphique Rcmdr de R. Préalablement à la réalisation des ANOVAs, l'homogénéité des variances a été vérifiée. A la suite de l'analyse, la normalité des résidus a également été vérifiée. Lorsque l'ANOVA n'a pas pu être réalisée pour non-respect de l'une ou l'autre des conditions, un test de rang de Kruskal Wallis (test non paramétrique) a été réalisé.

Résultats

Chapitre 1

Diversité génétique et dissémination de l'espèce

Brettanomyces bruxellensis dans le vin

Les travaux menés ces 15 dernières années ont montré que l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* présentait une diversité génétique et phénotypique importante. De plus, elle a été isolée dans différentes régions du monde et dans de nombreuses matrices fermentées dans lesquelles elle constitue une menace (vin) ou une opportunité de diversification des produits (bière, Kombucha) ou encore, d'amélioration des rendements de conversion (bioéthanol). Il apparaît donc indispensable de mieux caractériser la diversité génétique et phénotypique de l'espèce, afin de mieux cerner les mécanismes à l'origine de son adaptation à chaque milieu.

Ces travaux de thèse s'inscrivant dans un contexte œnologique, nous avons donc étudié la diversité et la dissémination des isolats de *B. bruxellensis* du vin à l'échelle du globe et comparé ces résultats avec ce qui est observé à l'échelle du vignoble bordelais et du chai.

1 La collection

Au cours de cette thèse et de celle de Marta Avramova, une large collection d'individus appartenant à l'espèce *B. bruxellensis*, isolés à partir de matrices fermentées différentes et dans de nombreuses zones géographiques, a été constituée. Nous avons ainsi collecté des individus originaires du vin, de la bière, de la tequila, du cidre, du bioéthanol, du kombucha et d'autres boissons non alcoolisées (Annexe 3). Une partie importante de cette collection a tout d'abord été isolée et fournie par des collaborateurs de laboratoire du monde entier (683) ou étaient déjà présents dans la collection du laboratoire (122).

Notre collection comprend 2210 isolats de vin (Figure 22, page suivante). Isolés à différents stades de vinifications, ces individus proviennent de zones viti-vinicoles situées sur plusieurs continents (Afrique du Sud, Australie, Brésil, Europe, Etats-Unis d'Amérique) et de plusieurs régions pour certains pays (France et Italie). Un total de 630 isolats de vin a ainsi été récolté par M. Avramova. Nombre d'individus ont ensuite été isolés dans le cadre du plan d'échantillonnage dans le vignoble bordelais décrit en matériels et méthodes (1458 isolats). Les vins d'isolement ont été collectés à différents stades de vinification : FA, FML et principalement élevage en barrique dans plusieurs châteaux pour les millésimes 2013, 2014 et 2015. D'autres proviennent de vins en bouteille (117).

Les isolats de vins de millésimes anciens (<1990) proviennent de Californie pour 3 d'entre eux, et du bordelais pour tous les autres (105). Ils sont issus de travaux antérieurs menés au laboratoire (7), de collections extérieures (3) et d'isolements dans des bouteilles de vins rouges de millésimes anciens réalisés au cours de cette thèse (98) (Figure 23, page suivante). Conformément à ce que remarquait Renouf (2006), la majorité des bouteilles échantillonnées contenaient des isolats de *B. bruxellensis* viables et cultivables. Tous les

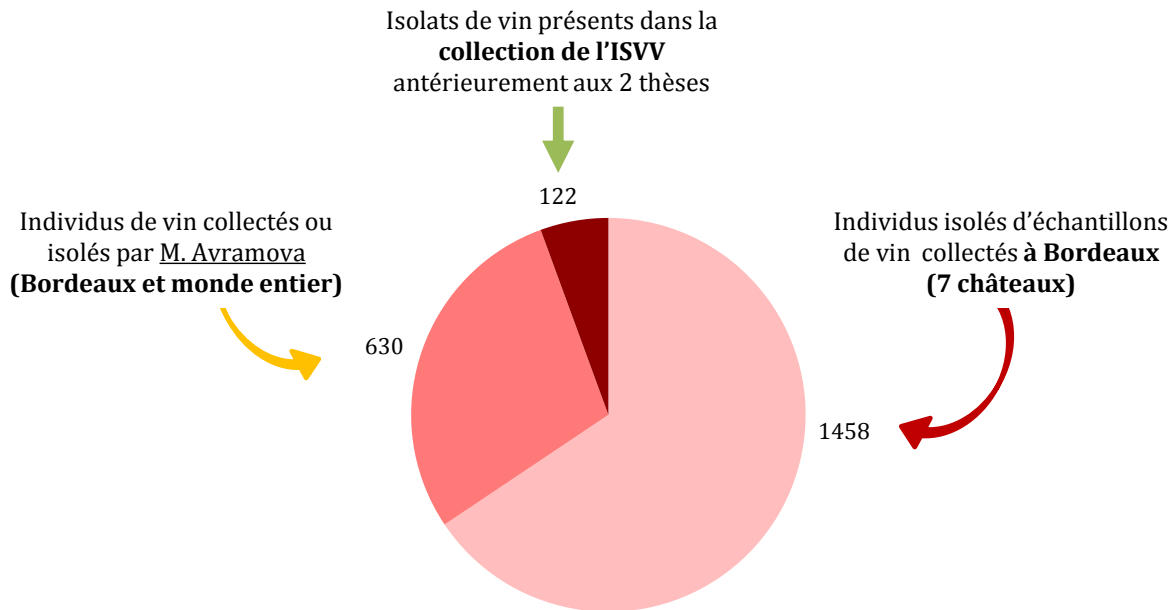


Figure 22 : Origine des isolats du vin de la collection.

Notre collection comprend 2210 isolats de vin issus de la collection antérieurement présente à l'ISVV (122), collectés dans le cadre de la thèse de M. Avramova (630) et de cette thèse (1458). L'ensemble de ces isolats a été typé par PCR TYPEBRETT.

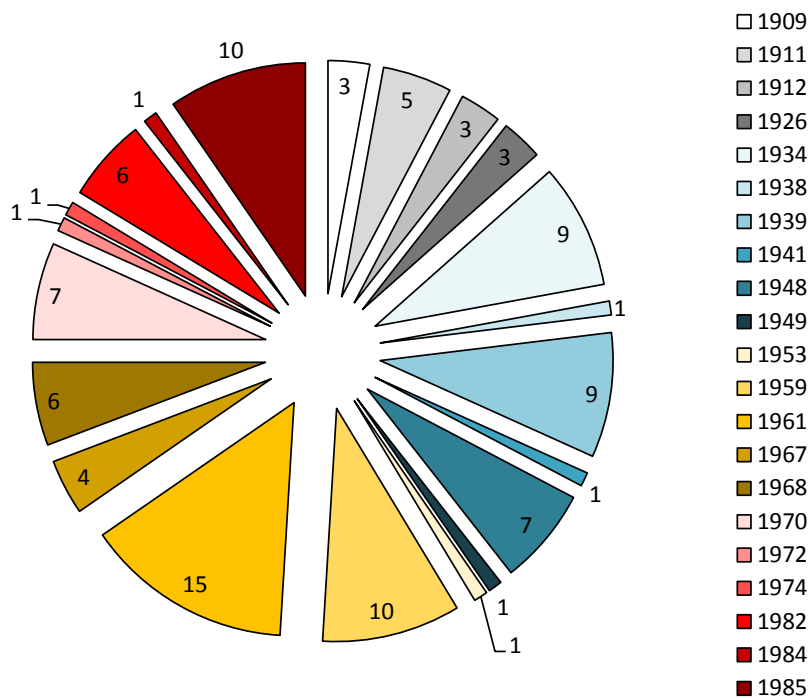


Figure 23 : Nombre d'individus isolés sur des millésimes anciens (antérieurs à 1990) et génotypés par outil microsatellite.

échantillons contaminés contenaient des phénols volatils. Cela confirme les capacités importantes de survie de cette espèce dans le vin en bouteille.

L'ensemble des isolats collectés a été typé par l'outil TYPBRETT, afin de vérifier leur appartenance à l'espèce *B. bruxellensis* et de déterminer leur groupe génétique. Puis, une grande partie (1488 isolats) a ensuite été génotypée par analyse PCR ciblant 12 marqueurs microsatellites. La sous-collection génotypée comprend 1488 isolats de 29 pays et de 9 substrats différents, la majorité des isolats typés provenant du vin (1318). Parmi les isolats de vins génotypés, 80% proviennent de France et 55% de la région de Bordeaux (Figure 24). Les isolats récents (>2010) de Bordeaux sont les plus fortement représentés parmi les isolats de vin étudiés (552/1318).

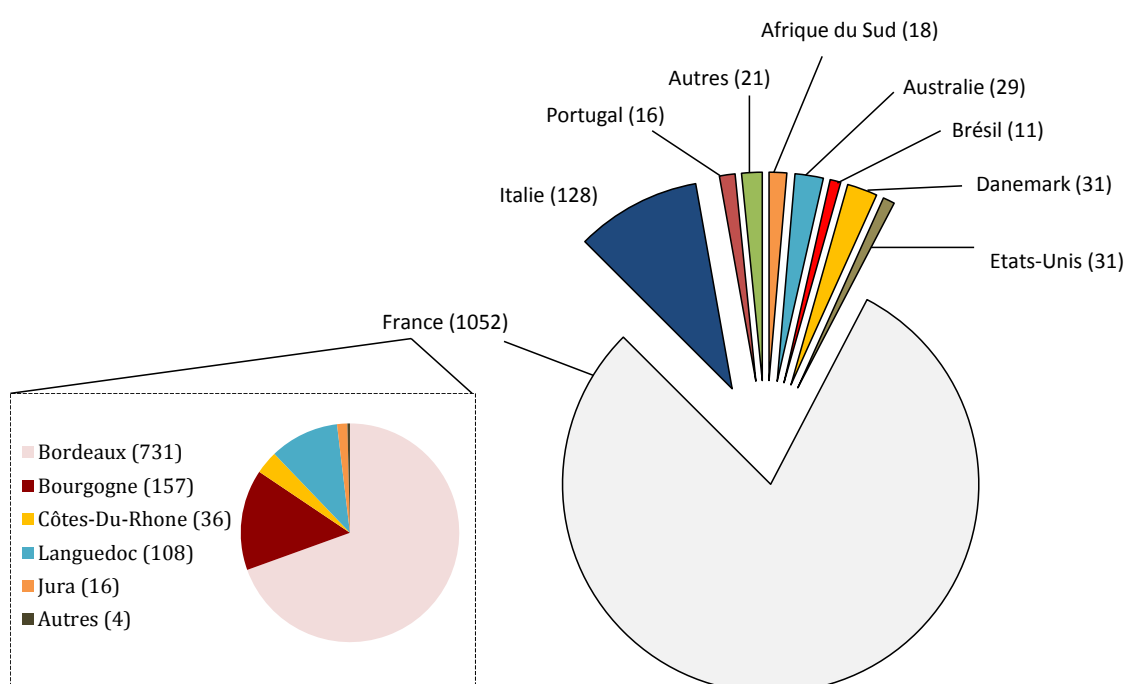


Figure 24 : Répartition des isolats de vin, dans les pays et dans les différentes régions de France échantillonnées.

L'ensemble de ces 1318 isolats a été génotypé par outil microsatellite.

2 Diversité génétique globale de l'espèce

A partir de la collection génotypée de 1488 isolats, les premiers travaux ont consisté à étudier la diversité génétique et la structuration de la population en fonction du niveau de ploïdie, des origines écologiques et géographiques des individus. Cette étude fait l'objet de la thèse de Marta Avramova et est décrite dans la publication d'*Avramova et al.* récemment soumise ([Annexe 3](#)). Ci-après sont repris les principaux résultats obtenus, nécessaires à la compréhension de la suite du manuscrit.

Les données brutes obtenues par l'amplification des microsatellites correspondent aux allèles (différents par la longueur de la séquence microsatellite amplifiée) par locus et par souche. Pour chaque locus, plusieurs allèles ont été identifiés et certains loci présentent une diversité allélique importante (jusqu'à 18 allèles/locus) (Annexe 3, Supplementary Table S-2.1). Tous les isolats sont hétérozygotes pour au moins un locus (au moins 2 allèles/locus) et environ 50% d'entre eux présentent 3 allèles pour certains loci. Ceci permet de définir le niveau de ploïdie de chaque isolat : les isolats ayant jusqu'à deux allèles par locus sont considérés comme diploïdes (2n) et ceux présentant jusqu'à 3 allèles par locus comme triploïdes (3n). Une minorité d'individus 4n ou 5n a également été retrouvée.

La proximité génétique des isolats a été étudiée en utilisant la distance de Bruvo et la méthode d'agrégation dite du 'Neighbour Joining'. Cette méthode a été choisie car elle est robuste et elle est appropriée pour l'analyse des distances génétiques entre populations présentant plusieurs niveaux de ploïdie. Un dendrogramme, arbre représentant la proximité génétique en fonction du nombre et du type d'allèles par locus pour chaque souche, a été construit (Figure 25). Six groupes génétiques ont été définis à partir de cette représentation dont trois principaux, **triploïde AWRI1499-like** (Vin), **triploïde AWRI1608-like** (Vin et bière) et **diploïde CBS2499-like** (Vin) et trois autres groupes « minoritaires », **triploïde L0308-like** (Vin), **triploïde CBS5512-like** (Bioéthanol et téquila), **diploïde L14156-like** (Kombucha).

Ces travaux confirment à grande échelle l'existence de l'état **triploïde** dans la population de *B. bruxellensis*, en cohérence avec les analyses génomiques publiées (Curtin *et al.*, 2012 ; Borneman *et al.*, 2014 ; Fournier, Gounot *et al.*, 2017). Cet état est hautement prévalent dans la population étudiée (57,8% des isolats ont 3 allèles pour au moins 1 locus) et est retrouvé dans de nombreuses niches écologiques et zones géographiques.

Le regroupement des individus est associé à leur niveau de ploïdie ainsi qu'à leur matrice fermentée d'origine :

- > Le **niveau de ploïdie** est le premier facteur explicatif de la structure de la population étudiée ; il explique en effet 46,9% de la variance (AMOVA).
- > L'impact de la **matrice fermentée d'origine** est significatif, mais moindre (5,96% de la variance).
- > L'**origine géographique** est également impliquée dans la structuration de la population, néanmoins elle a nettement plus d'impact sur les individus non isolés du vin (54,8%) que sur les isolats du vin (3,7%).

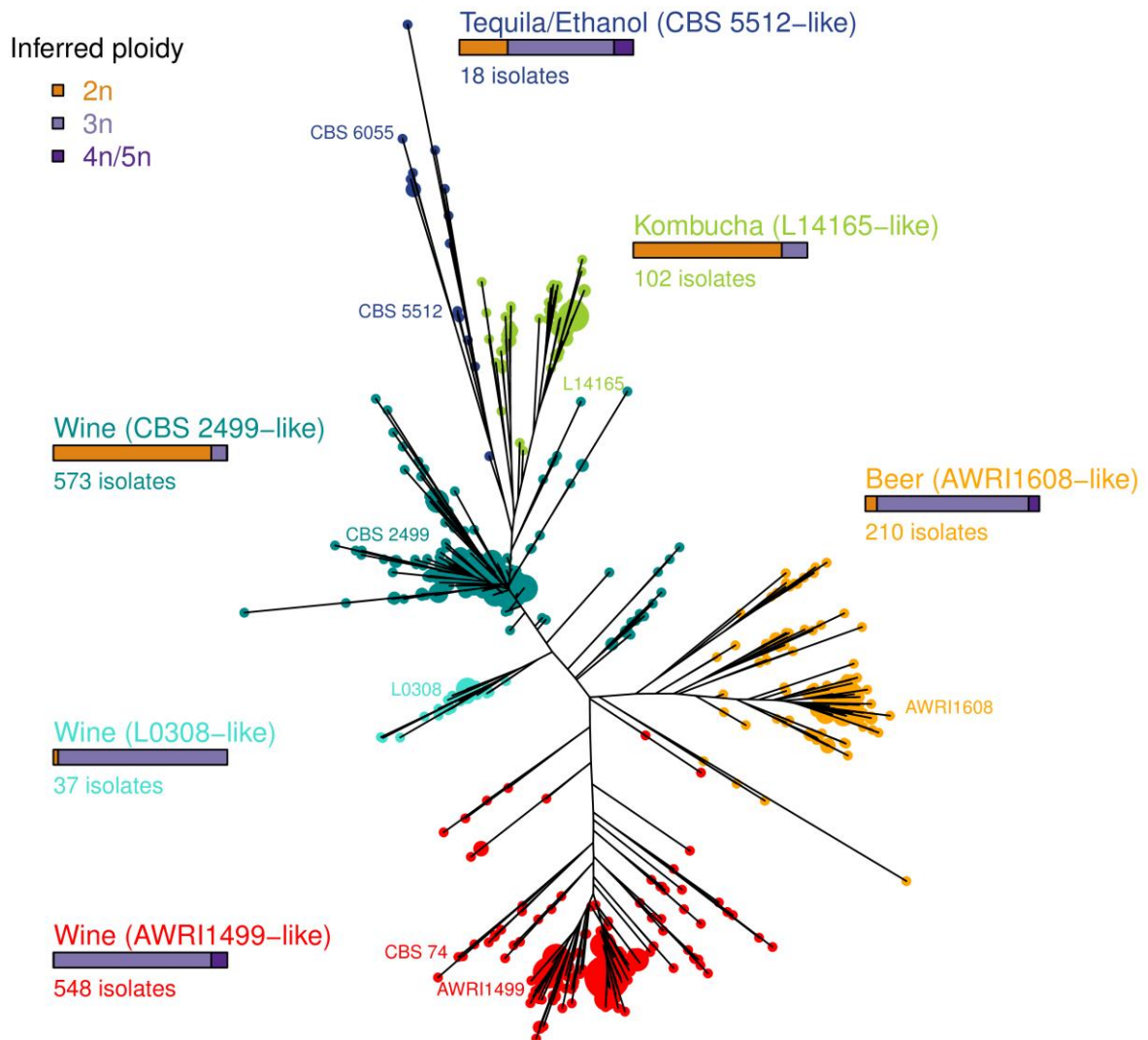


Figure 25 : Dendrogramme représentant 1488 isolats de *B. bruxellensis* génotypés à l'aide des 12 marqueurs microsatellite (Avramova *et al.*, soumis, Annexe 3).

Ce dendrogramme a été réalisé à l'aide du package *poppr* (logiciel R) en utilisant la distance de Bruvo et la méthode du Neighbour Joining. Six clusters ont été considérés et sont représentés par différentes couleurs. Chaque point représente un génotype. La taille des points est proportionnelle au nombre d'individus partageant un même génotype. Le niveau de ploïdie a été attribué en fonction du nombre maximal d'allèles obtenus par locus.

Ces travaux suggèrent une dispersion très importante des isolats du vin à l'échelle du globe. L'étude de la dissémination spécifique de ces populations issues de vin en fonction de leur groupe génétique fait l'objet des paragraphes suivants.

3 Structuration de la population dans un contexte œnologique

3.1 Distribution des isolats du vin dans les groupes génétiques identifiés par Avramova *et al.* (2017)

Parmi les 1488 isolats génotypés, 1318 sont d'origine œnologique. Cinq des six groupes génétiques décrits par Avramova *et al.* (soumis) sont représentés, un seul individu se classant dans le 6^{ème} groupe CBS5512-like (Figure 26 et Tableau 15). La majorité des isolats appartient aux groupes AWRI1499-like, AWRI1608-like et CBS2499-like. Au total, sur les 1318 individus, 543 génotypes sont répertoriés : certains génotypes sont donc partagés par plusieurs individus, ce qui indique la présence de populations clonales dans notre collection.

Dans notre collection d'isolats de vin, les groupes diploïde CBS2499-like et triploïde AWRI1499-like sont représentés à hauteur égale, chacun regroupant environ 40% des isolats et 34% des génotypes (Tableau 15). L'analyse du minimum spanning tree (Figure 26, page suivante) suggère que les génotypes du groupe CBS2499-like sont globalement moins distants génétiquement que ceux du groupe AWRI1499-like. Le groupe AWRI1608-like est moins représenté que les deux autres (14% des isolats). Il présente une diversité intra-groupe plus importante en termes de nombre de génotypes (114 génotypes/185 individus : en moyenne 1 à 2 individus par génotype contre environ 3 pour les deux autres groupes).

Tableau 15: Répartition des 1318 isolats du vin et de leurs génotypes dans les clusters identifiés par analyse des microsatellites.

Entre parenthèse sont indiqués les pourcentages d'isolats et de génotypes identifiés dans chaque groupe dans notre collection par rapport aux totaux.

Nom du groupe	Nombre d'isolats	Nombre de génotypes	Niveau de ploïdie (de la majorité des isolats)
CBS2499-like	517 (39%)	182 (34%)	Diploïde
AWRI1499-like	537 (41%)	187 (34%)	Triploïde
AWRI1608-like	185 (14%)	114 (21%)	Triploïde
L0308-like	36 (3%)	25 (5%)	Triploïde
L14165-like	42 (3%)	34 (6%)	Diploïde
CBS5512-like	1 (<1%)	1 (<1%)	Triploïde
Total	1318	543	

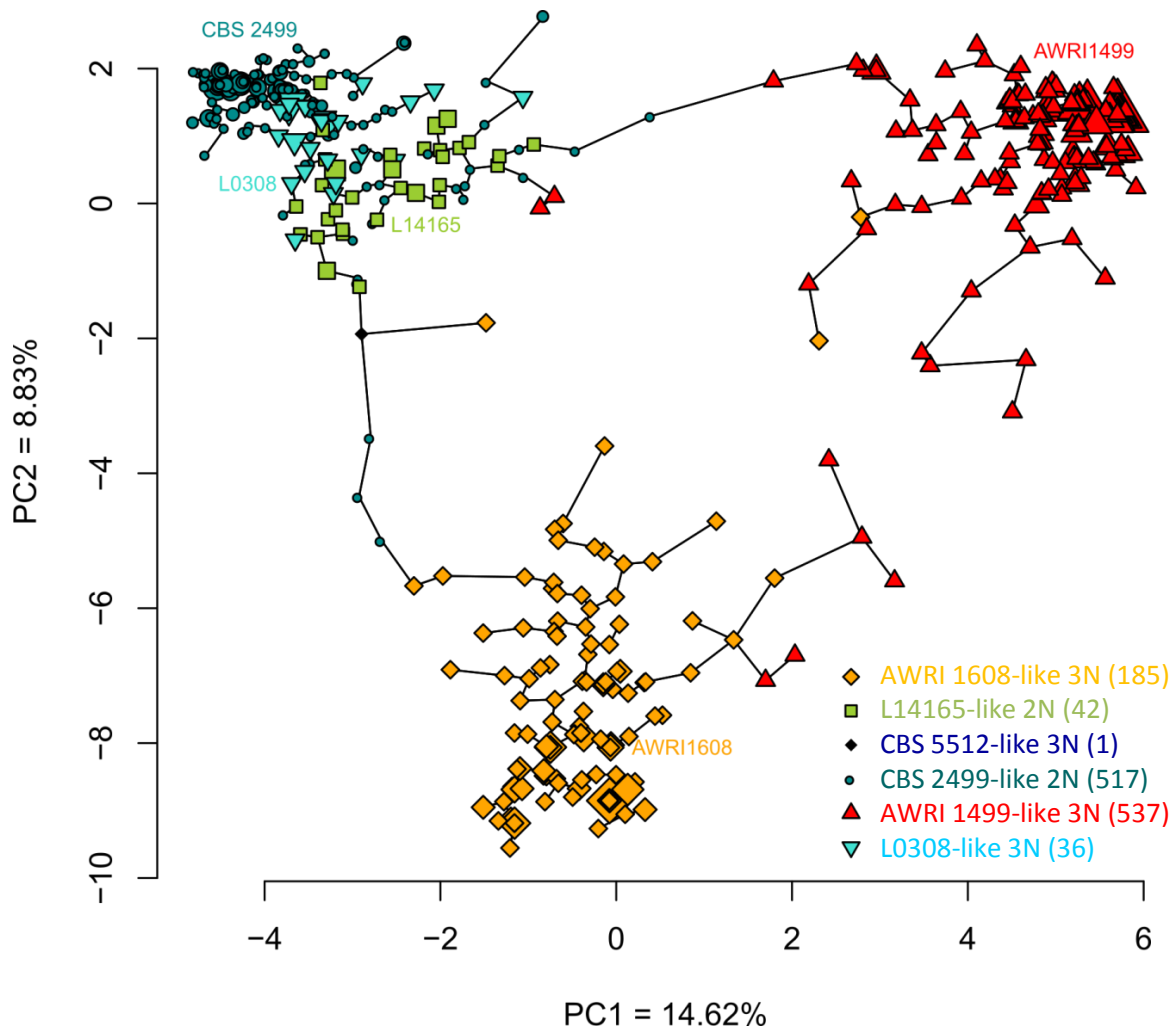


Figure 26 : Analyse en composante principale (ACP) des distances génétiques entre les 1318 individus de *B. bruxellensis* isolés du vin et génotypés à l'aide de 12 marqueurs microsatellites.

L'analyse a été réalisée grâce au package *ade4* fourni dans le logiciel R. Lorsque des isolats présentaient des données manquantes pour certains loci, celles-ci ont été remplacées par celles de leur voisin le plus proche, en se basant sur la distance de Bruvo (moins de 6% de données manquantes). Seuls, les deux premiers axes (PC1 et PC2) sont représentés. Le minimum spanning tree a été construit en utilisant la fonction *chooseCN* du package *adegenet* de R. La taille de chaque point est proportionnelle (\log_{10}) au nombre d'isolats qu'il représente. La position et le nom des souches « de référence » de chaque groupe génétique sont indiqués. Dans la légende, 3N signifie groupe majoritairement constitué d'individus triploïdes et 2N représente les groupes diploïdes. Entre parenthèse sont indiqués le nombre d'isolats de vin associés à chaque groupe.

3.2 Distribution géographique des groupes génétiques

> A l'échelle internationale : diversité importante associée à chaque région viticole

Des isolats de vin en provenance notamment de l'Afrique du Sud, de l'Australie, du Brésil, des Etats-Unis d'Amérique et de plusieurs pays d'Europe ont été génotypés. Plusieurs groupes génétiques sont représentés dans chacun des pays étudiés et ce, quel que soit le nombre d'isolats génotypés pour chacun d'eux ([Figure 27](#), page suivante). De plus, dans chaque pays, on retrouve à la fois des *B. bruxellensis* appartenant à un groupe diploïde et d'autres appartenant à un groupe triploïde. L'état polyploïde est donc mondialement retrouvé dans le vin.

Le groupe diploïde CBS2499-like (bleu cyan) est présent dans tous les pays. Le groupe AWRI1608-like (orange) a également été identifié dans la majorité des pays, à l'exception de l'Afrique du Sud. Il est néanmoins moins représenté (en termes de proportions) que le groupe CBS2499-like (bleu cyan), sauf au Danemark. Le groupe triploïde AWRI1499-like (rouge) est représenté dans de nombreux pays étudiés, à l'exception du Danemark et du Brésil. Les sous-groupes diploïde L14165-like (vert olive) et triploïde L0308-like (bleu vert) sont principalement retrouvés en Europe, ainsi que dans certains pays éloignés géographiquement tels que le Brésil et l'Afrique du Sud respectivement. Ils sont globalement moins représentés que les trois précédents.

En France, 5 régions viticoles (Bordeaux, Languedoc, Bourgogne, Côtes-du-Rhone et Jura) ont été étudiées et 3 en Italie (Pouilles, Calabre et Campanie). Deux groupes génétiques au minimum sont représentés dans chaque région ([Figure 27](#), page suivante). Au Danemark, les isolats appartiennent à deux des 5 groupes génétiques, alors que 5 groupes génétiques sont représentés au Portugal. Néanmoins, le petit nombre d'isolats considérés dans certaines régions ou pays incite à considérer les proportions d'isolats de chaque groupe avec prudence. A Bordeaux, malgré le nombre plus important d'isolats et de châteaux représentés, les groupes CBS2499-like et AWRI1499-like sont majoritaires et 1% des isolats appartiennent au groupe AWRI1608-like.

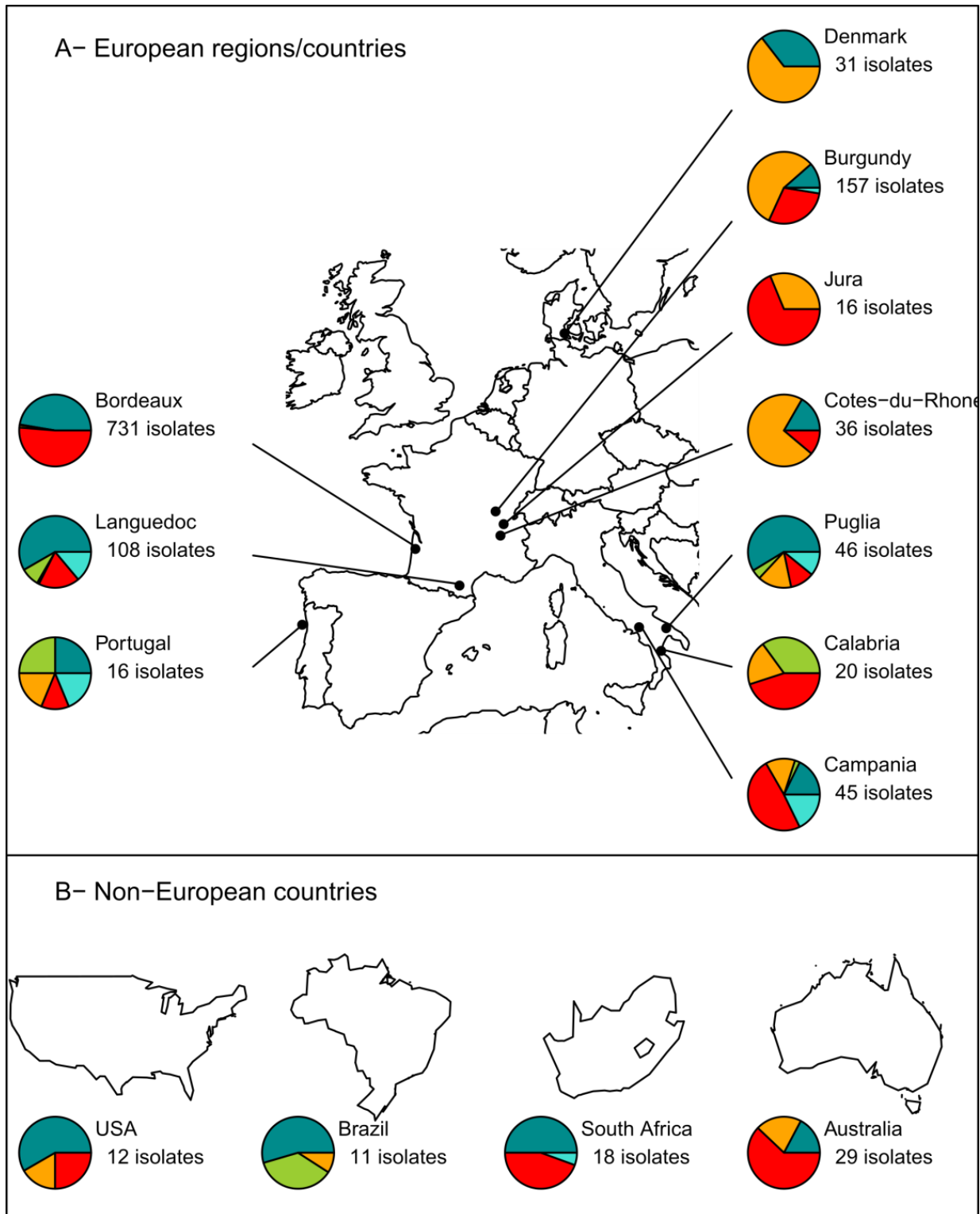


Figure 27 : Distribution des groupes génétiques dans différents pays et régions.

Sur les 1318 isolats du vin, l'origine géographique de 1276 est représentée. Les 42 individus restants ont une origine géographique inconnue ou bien sont présents en nombre inférieur à 10 dans un pays et n'ont donc pas été représentés. Les cartes représentant les pays ont été obtenues en utilisant le package maps de R. Les camemberts ont été réalisés en utilisant le package graphics. *Bleu cyan : groupe CBS2499-like (diploïde), orange : AWRI1608-like (triploïde), rouge : AWRI1499-like (triploïde), vert olive : L14165-like (diploïde), bleu vert : L0308-like (triploïde).*

> A l'échelle du vignoble bordelais

La collaboration étroite avec plusieurs châteaux du vignoble bordelais a permis de mener une étude plus poussée dans cette région. Aux 8 châteaux inclus dans le plan d'échantillonnage décrit dans la partie matériel et méthodes, se rajoutent 9 domaines viticoles pour lesquels des isolats ont été collectés dans plusieurs appellations du vignoble bordelais (Graves, Margaux, Pauillac, Pessac-Léognan, Pomerol et Saint-Emilion). Au total, 731 individus isolés dans le vignoble bordelais ont été génotypés. Dans l'ensemble, 196 génotypes distincts ont été identifiés, plaçant la très grande majorité des isolats dans les groupes diploïde CBS2499-like et triploïde AWRI1499-like ; 1% des souches appartiennent au groupe AWRI1608-like et moins de 1% au L14165like (Figure 28). Malgré le nombre important d'échantillons et d'isolats, les autres groupes ne sont pas représentés. Ceci pourrait être un artéfact dû au nombre limité de châteaux étudiés. Mais, il se pourrait aussi que ces groupes génétiques ne soient pas représentés dans le vignoble bordelais car ils n'y ont pas été introduits ou encore parce qu'ils ne s'y sont pas maintenus.

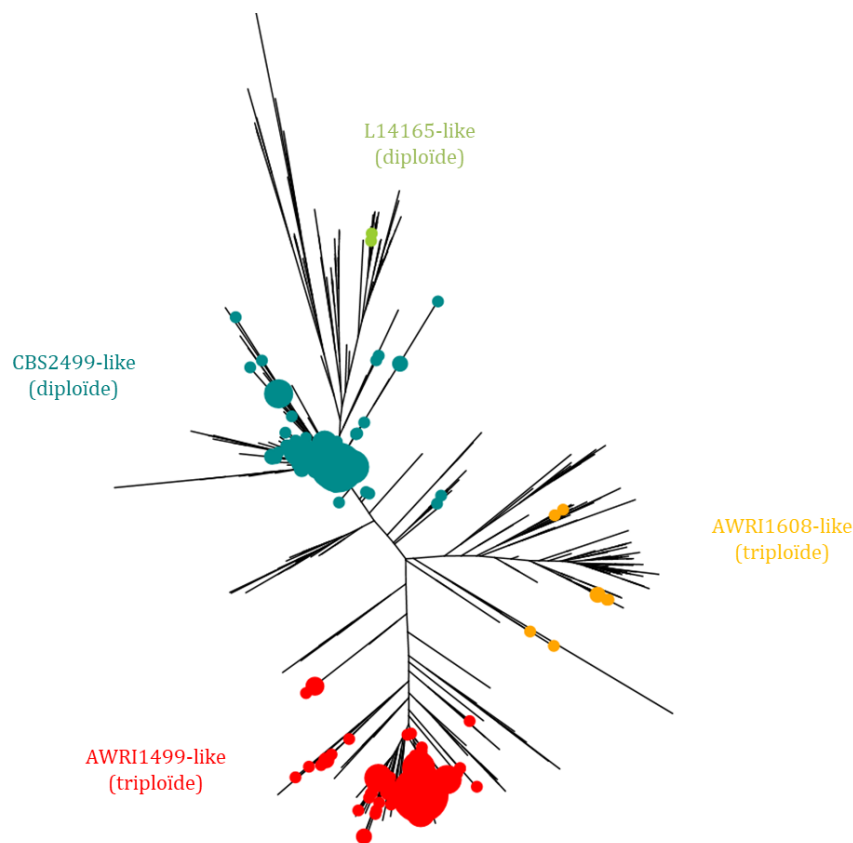


Figure 28 : Diversité génétique des isolats de *B. bruxellensis* du vignoble bordelais.

Sur le dendrogramme établi par Avramova et al. (2017), 731 isolats et 200 génotypes du vignoble bordelais sont représentés par des points de couleurs. La couleur correspond au groupe génétique auquel chaque individu appartient. Le même code couleur que pour les figures précédentes a été utilisé. Chaque point représente un génotype. La taille des points est proportionnelle au nombre d'individus partageant un même génotype.

L'analyse des profils microsatellites des isolats des 16 domaines (pas d'isolats du château A) indique que plusieurs génotypes sont retrouvés dans un même domaine et parfois, dans un même échantillon de vin (Tableau 16). En outre, dans 5 châteaux (B, C, E, F, G), des individus des groupes diploïdes et triploïdes coexistent, là aussi parfois dans un même échantillon de vin. De plus, des génotypes sont spécifiquement et uniquement identifiés dans certains châteaux (Tableau 16). Par exemple, dans le domaine E, sur 85 individus isolés sur plusieurs millésimes et dans plusieurs échantillons, 34 génotypes seulement ont été identifiés, ce qui suggère l'existence de populations clonales. Plusieurs isolats présentent par ailleurs un génotype spécifique de ce château (c'est-à-dire identifié nulle part ailleurs). Dans le château F, sur les 64 génotypes identifiés, 67% sont spécifiques du château. Cela signifie également que 33% des génotypes ont été identifiés dans au moins un autre château bordelais ou dans une zone géographique plus distante. Il est intéressant de noter que, bien que certains de ces châteaux soient distants de moins de 5km, un nombre important de génotypes spécifiques est présent dans chacun d'eux. C'est notamment le cas des domaines E et G qui, sur 34 et 84 génotypes, comportent respectivement 18 et 62 génotypes spécifiques.

Tableau 16: Informations relatives aux isolats collectés dans les châteaux du vignoble bordelais et génotypés.

Châteaux	Nombre d'isolats	CBS2499 (2n)	AWRI1499 (3n)	AWRI1608 (3n)	L14165 (2n)	Nombre génotypes	Nombres génotypes spécifiques	% génotypes spécifiques
B	13	5	6	2	NA	6	2	33
C	23	17	4	NA	2	12	5	42
D	17	17	NA	NA	NA	10	3	30
E	85	48	37	NA	NA	34	18	53
F	185	102	83	NA	NA	64	43	67
G	355	133	222	NA	NA	84	62	74
H	1	NA	1	NA	NA	1	0	-
I	11	NA	9	2	NA	11	9	82
J	10	10	NA	NA	NA	4	2	50
K	10	NA	6	4	NA	9	8	89
L	7	NA	7	NA	NA	6	6	100
M	3	3	NA	NA	NA	3	3	100
N	1	1	NA	NA	NA	1	0	-
O	1	1	NA	NA	NA	1	1	-
P	1	1	NA	NA	NA	1	1	-
Q	6	6	NA	NA	NA	6	6	100
Total	729*	344*	375	8	2		169	

* s'y ajoutent 2 individus isolés dans la région viticole de Bordeaux, mais dont le château d'isolement est inconnu, pour un total de 731 isolats.

3.3 Distribution des groupes génétiques dans le temps

Les isolats génotypés proviennent de vins de différents millésimes (1909 à 2015). Les individus isolés dans des vins produits avant 1990 (majoritairement de Bordeaux) appartiennent exclusivement au groupe diploïde CBS2499-like (Figure 29 et Tableau 17). Les autres groupes ne sont en effet retrouvés que dans les vins produits après 1990 à 2002 (Tableau 17). Dans la collection étudiée, la proportion d'individus du groupe triploïde AWRI1499-like, pourtant absente au départ, est plus importante que celle des autres groupes et dépasse celle du groupe diploïde CBS2499-like sur la période 2000 à 2014 (47% et 34% respectivement). Ces résultats confirment ceux d'Albertin *et al.* (2014) qui remarquaient que les individus isolés (8) dans des vins de millésimes relativement anciens (1938-1995) appartenaient tous à un groupe génétique majoritairement composé d'individus diploïdes.

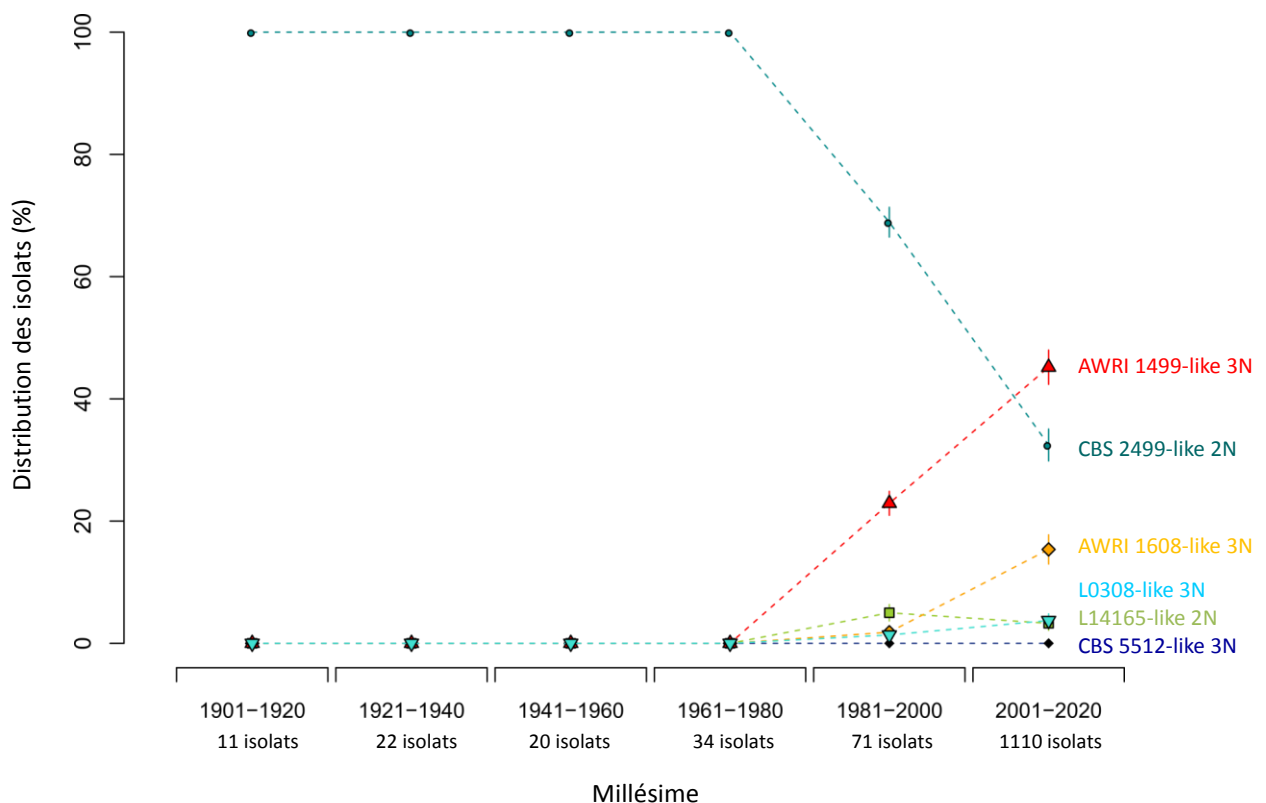


Figure 29 : Distribution des groupes génétiques au cours des millésimes.

Les proportions de chaque groupe ont été calculées sur des plages de 20ans. En dessous de chaque période est indiqué le nombre d'individus isolés pour la plage considérée. Afin de prendre en compte les écarts en termes de nombre d'isolats par plage de temps, des intervalles de confiance à 95% ont été calculés. Pour cela, 100 ré-échantillonnages (bootstrap) de la population ont été réalisés. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. *Bleu cyan : groupe CBS2499-like (diploïde), orange : AWRI1608-like (triploïde), rouge : AWRI1499-like (triploïde), vert olive : L14165-like (diploïde), bleu vert : L0308-like (triploïde).*

Tableau 17 : Groupe génétique et millésime correspondant au 1er isolement d'individus de notre collection dans le vin.

Groupe génétique	1 ^{er} isolement dans le vin
CBS2499-like (diploïde)	1909
AWRI1499-like (triploïde)	1990
AWRI1608-like (triploïde)	1995
L14165-like (diploïde)	1991
L0308-like (triploïde)	1994
CBS5512-like (diploïde)	2002

4 Migration et dissémination des individus de l'espèce

4.1 Structuration de la population : génotypes et groupes de clone

Au total, sur les 1318 isolats de vin génotypés, 543 génotypes distincts sont répertoriés. Dans cette partie de l'étude, deux individus partageant exactement le même génotype (ou profil microsatellite) seront désignés comme étant des « clones ». Les groupes de clones seront définis comme des groupes d'isolats (2 ou plus) présentant un même génotype. Au total, sur les 543 génotypes, 108 groupes de clones ont été identifiés et 883 isolats de notre collection s'y répartissent ([Tableau 18](#), [Figure 30](#), page suivante). Dans chaque groupe génétique, 12 à 25% des génotypes sont des groupes de clone. Dans les groupes AWRI1499-like et CBS2499-like, 2/3 des individus appartiennent à des groupes de clones ([Tableau 18](#)).

Certains de ces groupes de clones rassemblent des proportions importantes d'individus. A titre d'exemple, les génotypes **2**, **19** et **156** rassemblent respectivement 32%, 18% et 19% des individus des groupes AWRI1499-like, CBS2499-like et AWRI1608-like ([Figure 30](#)).

Les annexes 5, 6, 7 et 8 renseignent, pour chaque groupe génétique, sur les origines (millésime, pays) des individus présents dans chacun des groupes de clones.

Tableau 18: Distribution des génotypes « isolés » (représentés par un individu) et des groupes de clone dans les groupes génétiques.

	Nombre de génotypes	Génotypes « isolés »	Groupes de clone (GC)	Nombres d'individus dans GC (sur le nombre total d'individus dans le groupe génétique)
AWRI1499-like	187	154	33 (18%)	383/537
CBS2499-like	182	136	46 (25%)	381/517
AWRI1608-like	114	94	20 (18%)	91/185
L14165-like	34	28	6 (18%)	14/42
L0308-like	25	22	3 (12%)	14/38
Total	542*	434	108	883

*542 + 1 isolat du groupe CBS5512-like.

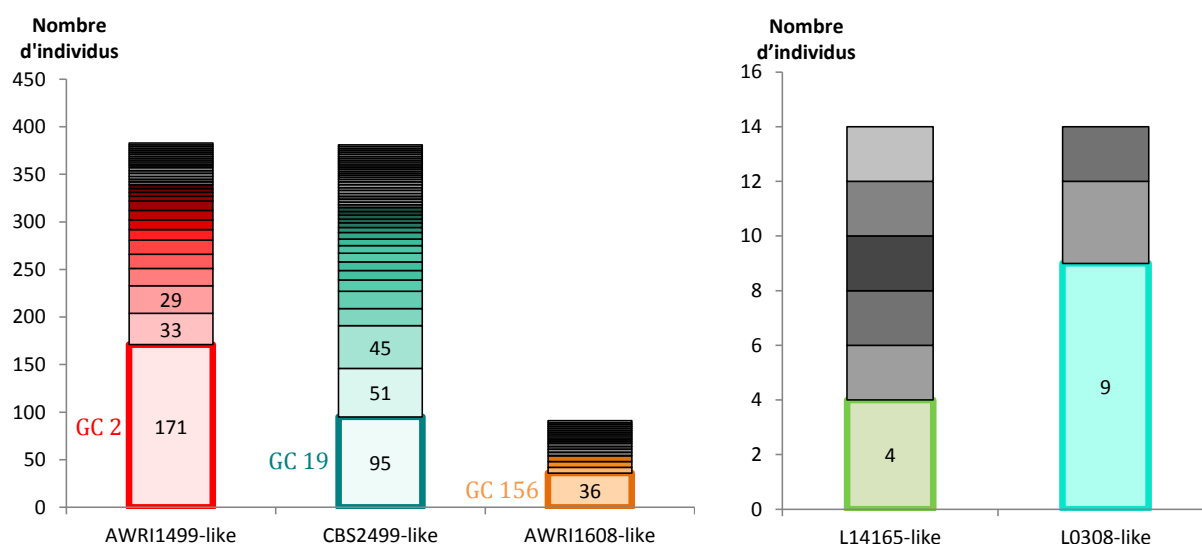


Figure 30 : Distribution des individus dans les groupes de clones en fonction des groupes génétiques.

Pour chaque groupe génétique, sont représentés en couleur les génotypes de plus de 3 individus. Les génotypes/groupe de clone les plus représentés dans la population de chaque groupe génétique sont encadrés à côté et le numéro qui leur a été attribué (sur un total de 543 génotypes dans la collection) est indiqué à côté.

4.2 Persistance temporelle des groupes de clones

La persistance des clones (présence sur plusieurs millésimes) a été étudiée sur 7 châteaux de la région bordelaise (B, C, D, E, F, G, L), 1 château de Bourgogne (R) et 1 château de Côtes du Rhône (S), pour lesquels des individus ont été isolés dans des vins de plusieurs millésimes (Figure

31). Sur cet échantillon, 8 à 26% des clones identifiés dans un château ont été isolés lors d'au moins deux millésimes différents.

Sur les 9 châteaux, 38 groupes de clones persistants (présents sur au moins deux millésimes) ont été identifiés ; ils appartiennent aux 3 groupes génétiques principaux (CBS2499-like, AWRI1499-like, et AWRI1608-like) (Figure 31). Certains sont retrouvés sur deux années consécutives ou proches. Parmi les clones du groupe diploïde CBS2499-like, certains persistent sur des intervalles de 20 à 80 ans (isolats du groupe 16, château F, prélevés à 87 ans d'intervalle). Il est à noter que le génotype 19, principal groupe de clones CBS2499-like (Figure 31) est retrouvé, dans plusieurs châteaux sur plusieurs millésimes qui s'échelonnent de 1961 à 2014. Mais c'est également le cas de clones triploïdes AWRI1499-like qui, bien qu'ayant été isolés plus récemment, peuvent être retrouvés sur une période de près de 25 ans (groupes clonaux 8 et 9, château E, Figure 31).

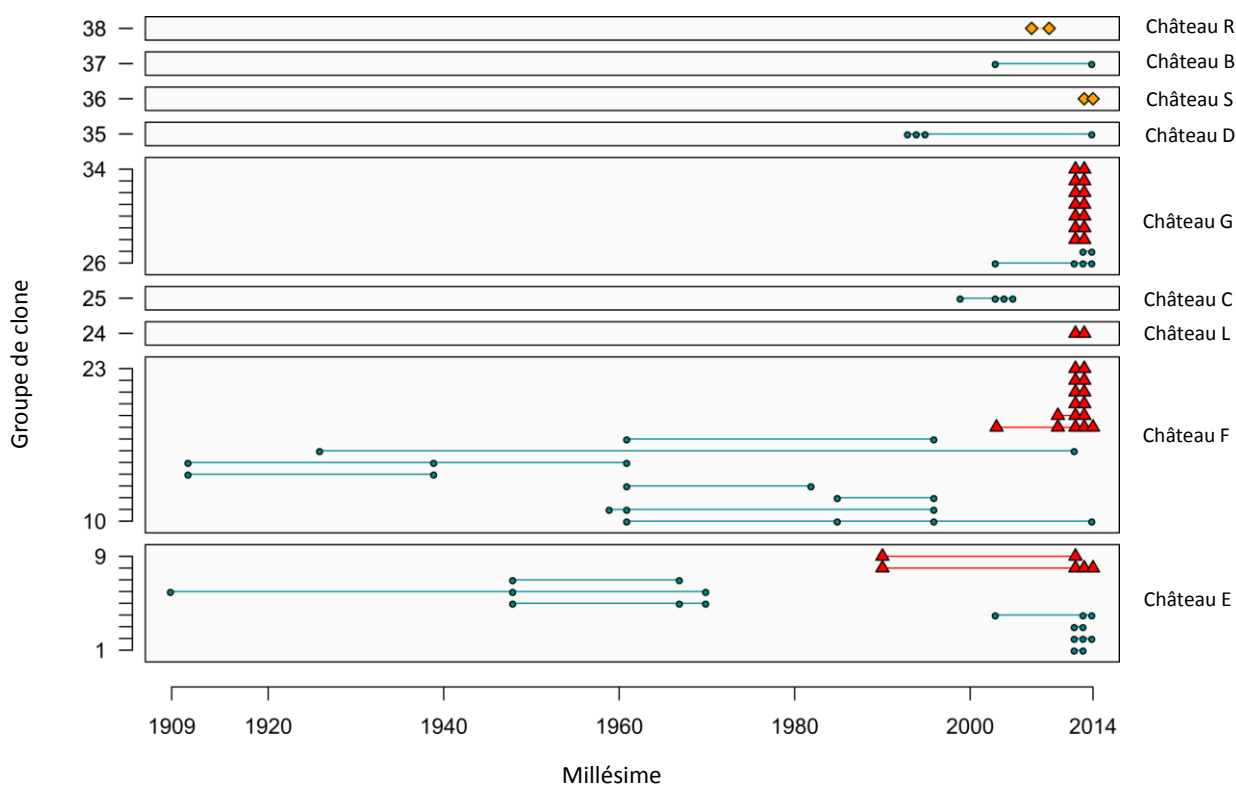


Figure 31 : Identification des groupes de clones présents sur plusieurs millésimes dans 9 châteaux.

Les isolats partageant un génotype identique forment un groupe de clones « Clone group ». Pour chaque château, des groupes de clones (GC) isolés sur plusieurs millésimes ont été identifiés. Au total, 38 groupes de clones répartis sur 9 châteaux et isolés sur plusieurs millésimes ont été identifiés. Chaque point représente un à plusieurs clones. *Bleu cyan* : groupe CBS2499-like (diploïde), *orange* : AWRI1608-like (triploïde), *rouge* : AWRI1499-like (triploïde). Les numéros de GC attribués dans cette figure représentent les groupes de clones persistants (1 à 38). Ils ne correspondent néanmoins pas aux numéros attribués aux génotypes dans notre collection.

Les isolats des millésimes anciens proviennent tous de bouteilles (et l'isolement a été réalisé récemment) alors que ceux des millésimes plus récents (à partir de 2000) proviennent également des environnements fermentaires ou du vin en barrique et l'année d'isolement est très proche de celle du millésime. Ainsi, pour certains groupes diploïdes (« Clone group » 10) ou triploïdes (« Clone group » 8 et 9), des génotypes isolés en bouteilles dans les années 60 à 90 ont été retrouvés dans des échantillons plus récents issus de la FA, de la FML ou de l'élevage pour un même château ([Figure 31](#)).

Cette persistance clonale suggère que, indépendamment du niveau de ploïdie, certains individus sont particulièrement adaptés au milieu dont ils sont isolés, et qu'il existe des populations résidentes au chai capables d'y survivre sur de longues périodes de temps. De plus, plusieurs groupes de clones coexistent parfois dans un même château sur plusieurs millésimes ([Figure 31](#)). Ainsi, une à plusieurs populations clonales peuvent être responsable de l'altération des vins dans un château sur plusieurs décennies.

Les durées de persistance sont néanmoins à interpréter avec quelques précautions. En effet, l'échantillonnage des vieux millésimes (<1990) a été réalisé sur des bouteilles ayant déjà été au moins une fois rebouchées. Ces opérations de rebouchage permettent de vérifier l'état de conservation du vin, d'éliminer les bouteilles potentiellement altérées et de remplacer les bouchons. Généralement réalisée au chai, dans les châteaux prélevés, cette opération peut donner lieu à des contaminations des bouteilles par les populations présentes au chai à ce moment-là. En conséquence, certaines populations isolées dans des bouteilles de 1911 par exemple peuvent s'y être implantées plus tardivement, lors de ces opérations. Néanmoins, certains génotypes diploïdes sont spécifiques de ces millésimes anciens ([Annexe 6](#)), ce qui suggère l'implantation d'une majorité des populations présentes dans ces échantillons à ces périodes-là. D'autres génotypes, isolés sur des bouteilles de millésimes plus récents (1990) non rebouchés, ont également été isolés dans des échantillons de vin en fermentation ou en élevage confirmant leur présence et leur persistance dans l'environnement qu'est le chai.

4.3 Dissémination spatiale

Pour chaque groupe de clones du vin (108), la distance kilométrique séparant chaque paire de clones a été calculée ([Figure 32](#)). Il faut préciser dans un groupe de clone, les individus peuvent avoir été isolés dans un même château ou région ainsi que dans plusieurs pays. Les résultats montrent que 37% des clones sont co-localisés (distants de moins d'un kilomètre) et 90% sont dans la même région (distance inférieure à 100km). Ce résultat est en grande partie lié à la proportion importante d'individus isolés dans la région bordelais et à notre mode d'isolement

(plusieurs clones peuvent être issus d'un même échantillon de vin ou d'échantillons issus de la même barrique en élevage).

Néanmoins, 51 des 108 groupes de clones (47%) rassemblent des individus provenant de zones géographiques distinctes (>5 km) et 45% de ces 51 groupes de clones rassemblent des clones provenant d'au moins deux pays différents. La majorité de ces clones est dispersée à l'échelle intracontinentale, notamment en Europe (7% des paires de clone distantes de 100 à 4999 km). Certains sont également isolés à plus de 5000 km de distance (3% des paires de clone, [Figure 32](#)).

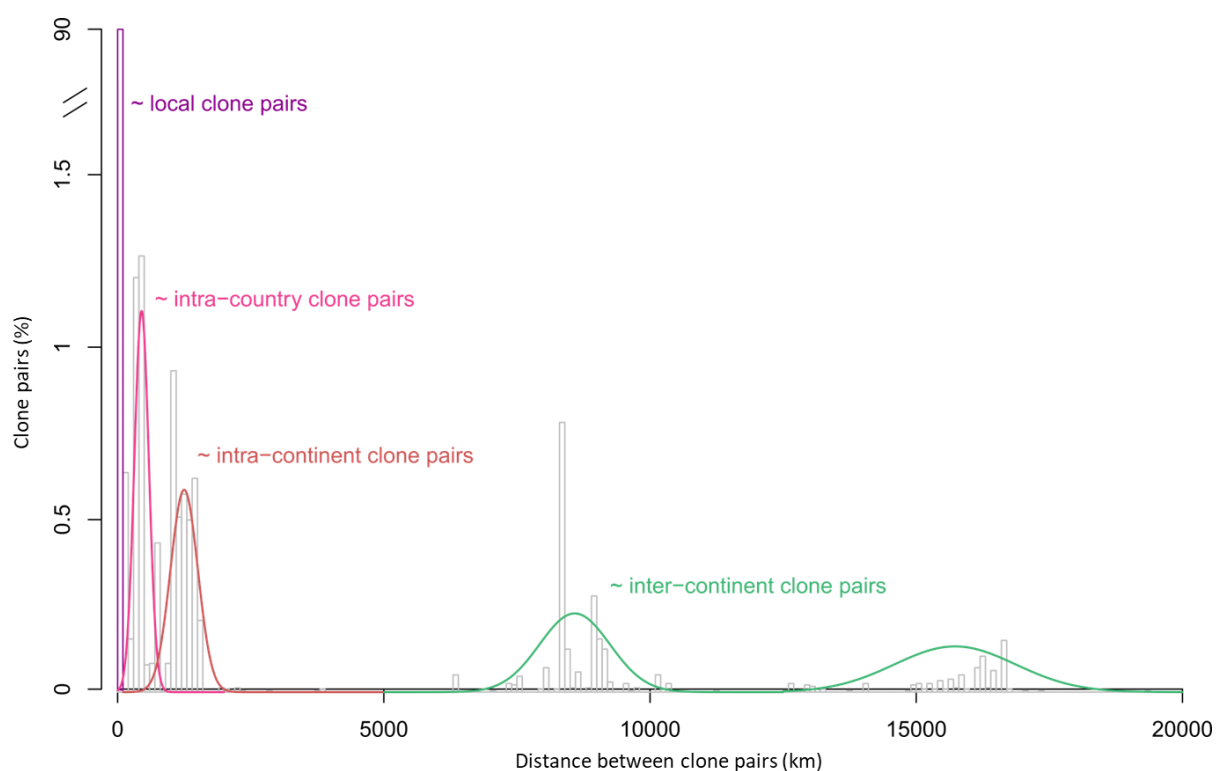


Figure 32 : Distribution des distances (km) entre chaque paire d'individus génétiquement identiques isolés dans des échantillons de vins.

Les paires de clone distants de moins de 100km ont été considérés comme des paires de clones locales (« local clone pairs »).

Certains groupes de clones sont donc retrouvés dans plusieurs pays. La [Figure 33](#) représente de façon schématique la localisation d'exemples de groupes de clones appartenant aux groupes génétiques CBS2499-like et AWRI1499-like. Les flèches entre les individus représentent les possibles échanges ayant conduit à leur dissémination.

De manière intéressante, le groupe de clones 19, principal groupe de clones CBS2499-like ([Figure 30](#)) est retrouvé dans 4 pays différents ([Figure 33, page suivante](#)).

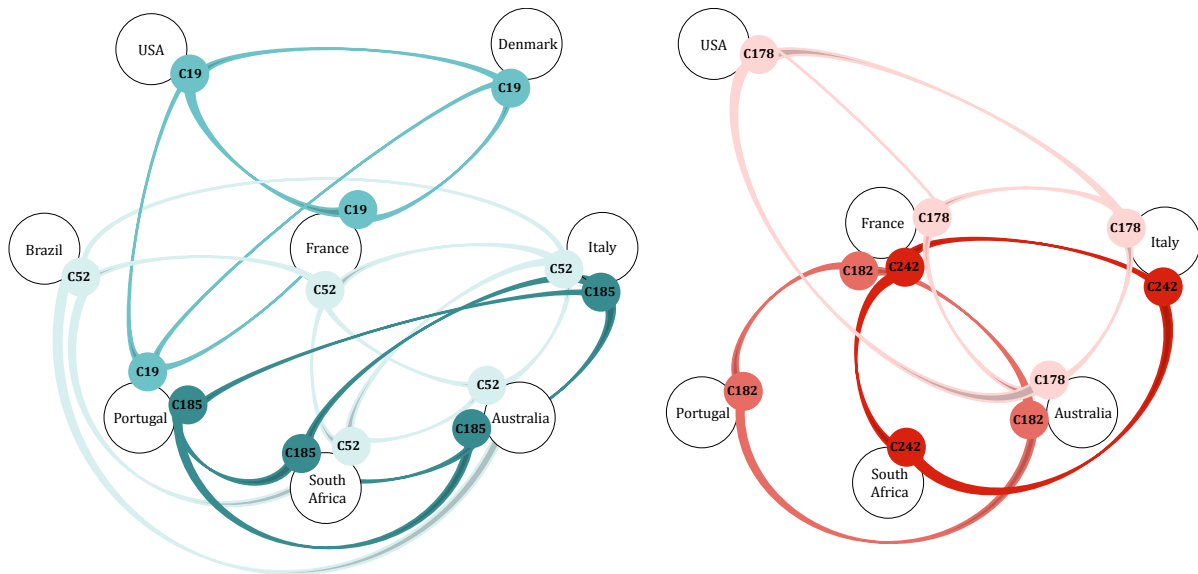


Figure 33 : Présence de certains groupes de clone du groupe CBS2499-like diploïde (à gauche) et AWRI1499-like triploïde (à droite) dans différents pays.

Ces données suggèrent des phénomènes d'échanges et de transports d'individus entre les pays. Néanmoins, la fréquence de dissémination des clones en fonction de la distance varie, dans notre collection, en fonction du groupe génétique considéré. Ainsi, seuls 4% des paires de clones du groupe AWRI1499-like sont distantes de plus de 100 km contre 22% pour le groupe CBS2499-like. Ceci pourrait encore une fois être un biais lié à l'abondance des clones bordelais et au mode d'échantillonnage de l'étude. Mais ceci pourrait aussi être lié à l'apparition récente du groupe AWRI1499-like qui a donc eu moins de temps pour se distribuer géographiquement.

Des taux de migration relatifs et directionnels ont été calculés entre chaque pays par comparaison des fréquences alléliques de chaque pays à celles des allèles communs aux deux populations (Sundqvist *et al.*, 2016). Du fait de leur mode de calcul, ces taux sont compris entre 0 et 1 (Figure 34). Plus le taux calculé entre A et B est élevé, plus le pool d'allèles et leurs proportions relatives dans la population A sont proches de ceux obtenus sur les deux populations A et B réunies. L'absence de flèches entre deux régions peut signifier que celles-ci ne partagent aucun allèle ou bien que leurs populations sont exactement les mêmes (en termes de nature et de ratio des allèles présents). Lorsque la migration est unilatérale, cela signifie que les deux pays partagent certains allèles et que la fréquence de chacun de ces allèles est systématiquement supérieure dans la population donneuse. Bien que le calcul des taux de migration repose sur des hypothèses de population à reproduction sexuée, ils fournissent une première idée du brassage allélique et des mouvements de migrations des individus à l'échelle d'un vignoble. Afin de vérifier que les flux directionnels entre deux populations sont significativement asymétriques, chaque taux de migration correspond à la moyenne des taux calculés lors de 100 ré-échantillonnages (bootstraps).

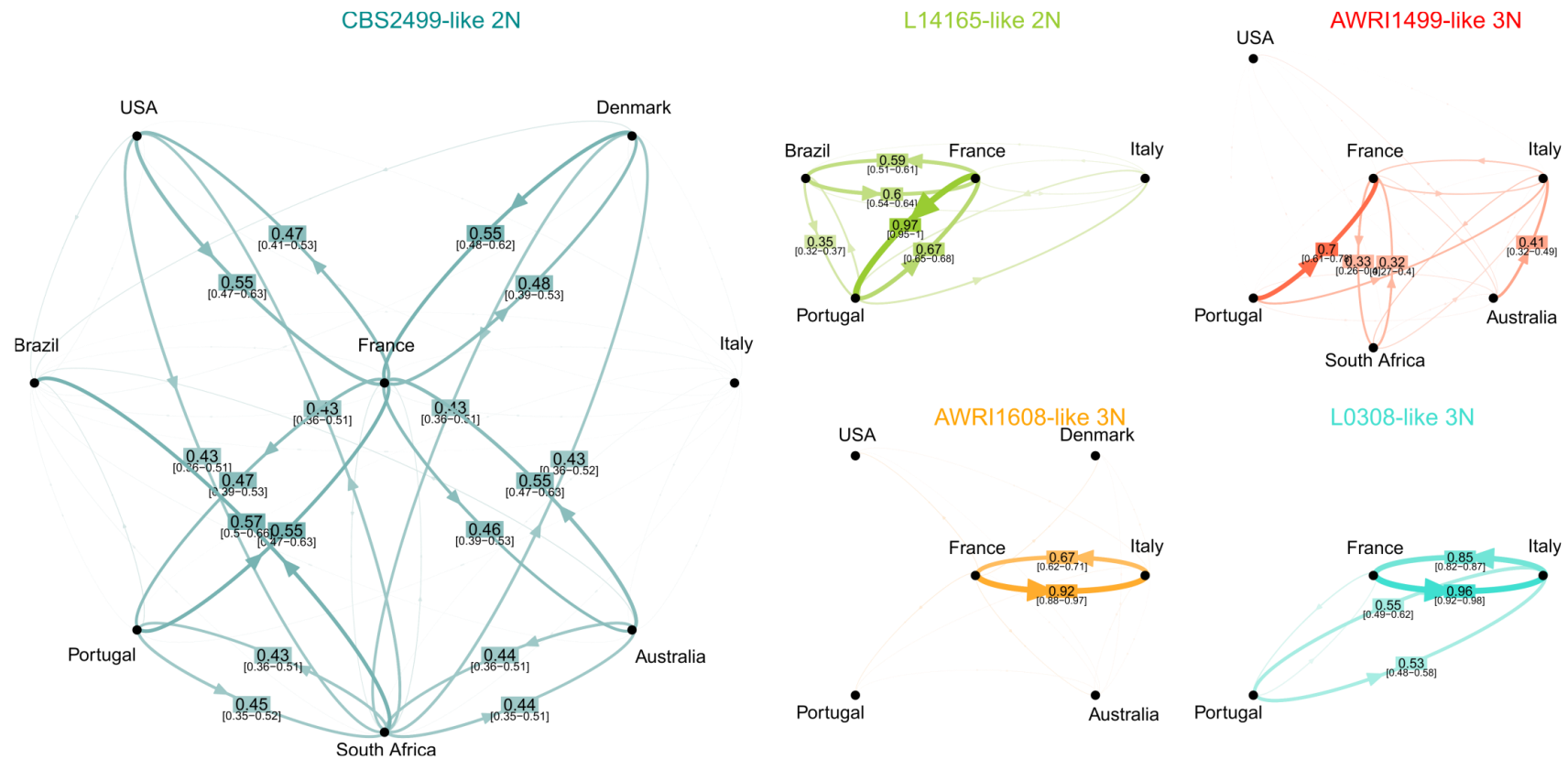


Figure 34 : Taux de migration relatifs pour chaque groupe génétique à l'échelle du globe.

Ils ont été calculés en utilisant le logiciel *divMigrate* (Sunqvist et al., 2016), intégré au package *Rcpp* de R. Les graphiques ont été réalisés grâce au package *qgraph* de R. Pour chaque groupe, les taux de migration représentent les flux d'allèles communs à deux populations d'un pays vers un autre. Ils sont calculés sur la base des fréquences de ces allèles dans une population comparativement aux fréquences moyennées des deux populations. Chaque taux est normalisé en fonction du taux de migration maximal attendu et se situe entre 0 et 1. Les taux de migration relatifs inférieurs à 0,3 ne sont pas affichés sur la figure. 100 ré-échantillonnages ont été réalisés afin d'estimer les taux de migration avec un intervalle de confiance de 95%, indiqué entre crochet. La taille de la flèche, sa largeur et l'intensité de la couleur associée sont proportionnelles au taux de migration relatif. Afin de prendre en compte les différences entre de tailles de population entre les pays, une taille fixe de population a été utilisée et elle correspond à la taille moyenne de la population entre deux pays. **Bleu cyan** : groupe CBS2499-like (diploïde), **orange** : AWRI1608-like (triploïde), **rouge** : AWRI1499-like (triploïde), **vert olive** : L14165-like (diploïde), **bleu vert** : L0308-like (triploïde).

L'analyse des taux de migration du groupe CBS2499-like montre que de nombreux pays partagent des allèles communs (Figure 34). L'Afrique du Sud et la France occupent une place centrale car ce sont les pays d'où et vers lesquels les échanges avec les autres pays sont les plus fréquents. Les taux de migration sont en moyenne de 0,5. Cela signifie que dans chacun de ces pays, à côté des allèles communs, des individus présentent également des allèles spécifiques. Ceci pourrait être lié à la dispersion de certains ancêtres CBS2499-like communs qui ont ensuite évolué possiblement pour une meilleure adaptation au milieu. L'Italie présente des taux de migration inférieurs à 0,3, ce qui suggère qu'une grande partie des isolats CBS2499-like de ce pays présentent des profils alléliques spécifiques et retrouvés uniquement dans les régions étudiées.

Les modèles de migration suggèrent également que, tout comme les groupes de clones, les allèles des deux autres groupes majoritaires, AWRI1499 et AWRI1608-like, sont moins dispersés que ceux du groupe diploïde CBS2499-like. Les populations sont plus spécifiques des pays d'isolement et les échanges semblent moins nombreux. En effet, pour le groupe AWRI1608-like, les échanges sont majoritairement localisés entre la France et le Sud de l'Italie. Ceci est possiblement lié à la proximité géographique des deux pays. Pour le groupe AWRI1499-like, des échanges ont lieu entre tous les pays. Néanmoins, les taux de migration suggèrent que le nombre d'individus échangés est plus faible et le taux de migration généralement inférieur à 0,3, sauf entre Portugal et France. La migration des individus appartenant aux groupes minoritaires L14165-like (vert-olive) et L0308-like (bleu vert), majoritairement localisés en Europe est également observée. Malgré les ré-échantillonnages réalisés, une analyse plus robuste des mouvements de migrations à l'échelle du globe nécessitera un nombre plus important d'isolats pour certains des pays représentés.

> Migrations à l'échelle du vignoble bordelais

A l'échelle du vignoble bordelais, 27 génotypes (14% des 169 génotypes du vignoble bordelais, 68% des 731 individus) sont retrouvés dans au moins deux domaines. Certains d'entre eux sont à la fois très représentés dans la collection et présents dans de nombreux châteaux. C'est encore une fois le cas du génotype 19 (99 individus), retrouvé dans 7 châteaux de la région bordelaise. Le groupe de clone 2 (170 isolats, AWRI1499-like) est également retrouvé dans tous les châteaux du vignoble bordelais dans lesquels des individus triploïdes ont été isolés, soit 6 châteaux (Figure 35).

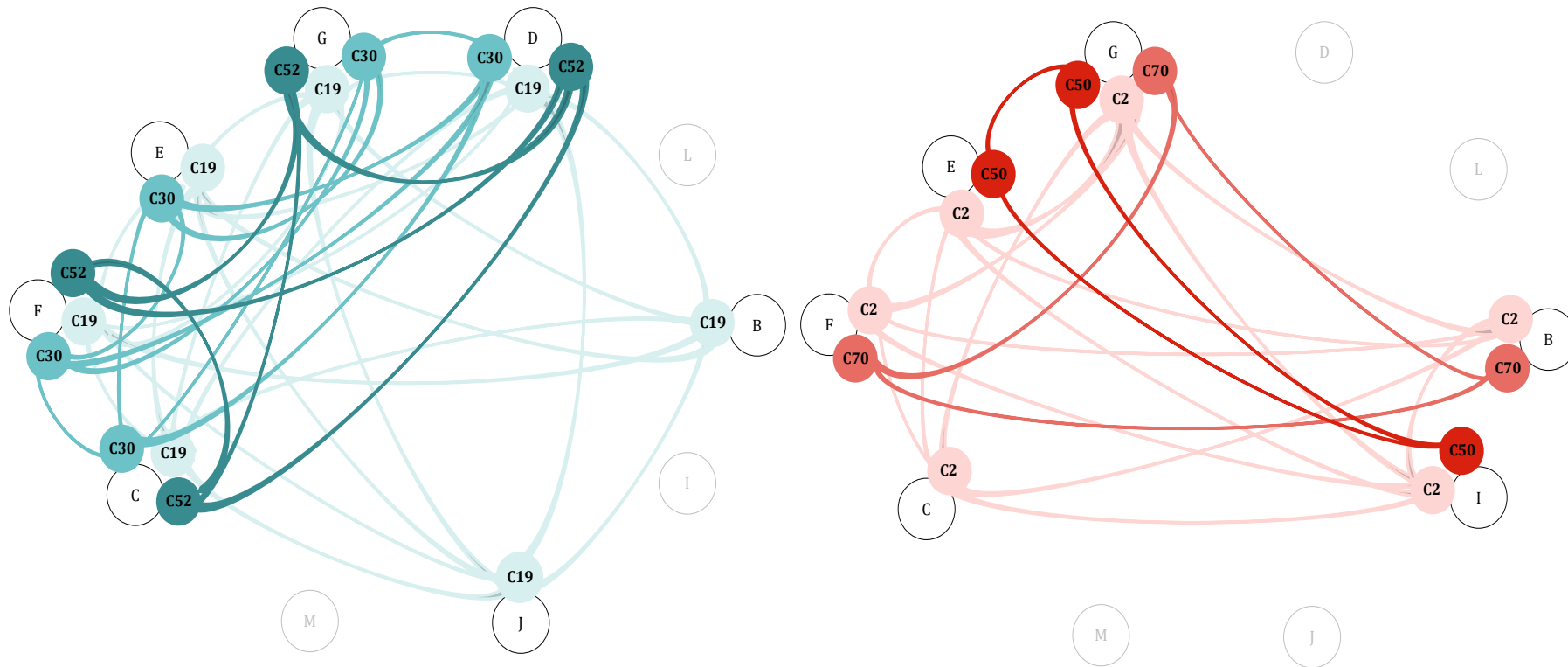


Figure 35: Présence de certains groupes de clone du groupe CBS2499-like diploïde (à gauche) et AWRI1499-like triploïde (à droite) dans des châteaux du vignoble bordelais.

De la même manière que précédemment, sur la base des fréquences des allèles présents dans chacun des châteaux, des modèles de dispersion ont été étudiés. Ils ont été réalisés sur les 10 châteaux pour lesquels au moins 10 individus avaient été génotypés (Figure 36). A l'image de ce qui est observé à l'échelle du globe, les individus du groupe CBS2499-like présentent des taux de migration moyens (0,3 à 0,53), signe de la présence de populations alléliques partagées, mais également spécifiques dans chacun des châteaux (Figure 36). Les migrations d'individus diploïdes sont principalement observées entre les châteaux F ou C et le reste des châteaux échantillonnés. Bien qu'ils ne soient pas de la même appellation et soient distants de plus de 20 km, les taux de migration entre ces deux châteaux sont également les plus importants (0,5). Les échanges entre châteaux séparés de moins de 5 km (G et D ou E et G par exemple, Figure 36) ne sont pas représentés, car les populations alléliques et leur ratio sont exactement les mêmes dans ces châteaux, suggérant un très fort brassage local pour ce groupe génétique.

Les individus du groupe triploïde AWRI1499-like présentent des taux de migration entre les châteaux très importants (aux alentours de 0,9). Cela suggère que les populations triploïdes présentes sont moins différenciées que celles des individus diploïdes pour les châteaux de la région bordelaise considérés. Le Médoc et en particulier le château A1 semble occuper une place centrale dans les échantillons étudiés.

Bien que ces analyses soient menées sur un nombre de châteaux restreint et que le nombre d'isolats considéré soit faible pour certains châteaux, cette analyse suggère l'existence de phénomènes d'échanges parfois importants entre domaines viticoles proches, mais aussi distants à l'échelle d'un vignoble. La plus faible différenciation selon les châteaux des compositions alléliques des individus AWRI1499-like (comparés aux individus CBS2499-like) pourrait être liée, une fois de plus à son apparition plus récente dans le vignoble.

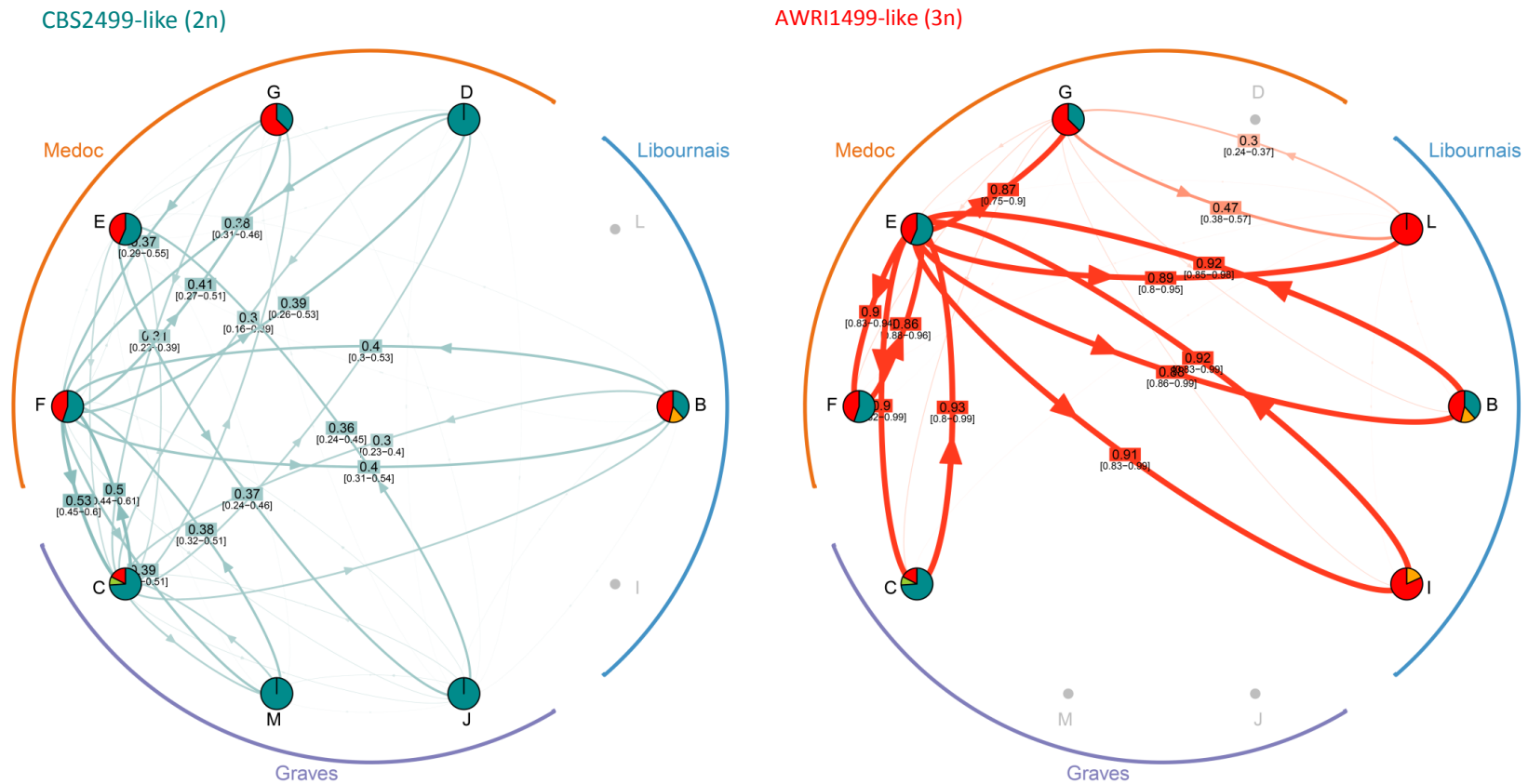


Figure 36: Taux de migration relatifs pour les groupes génétiques présents dans le vignoble bordelais.

Ils ont été calculés comme décrits dans pour la [Figure 34](#). Les trois principaux vignobles sont indiqués, au sein desquels plusieurs Appellations d'Origine Contrôlée (AOC) sont représentées. Le vignoble Libournais est représenté par 3 châteaux de l'AOC Saint-Emilion : châteaux I, B et L (11, 13 et 7 isolats respectivement). Les Graves sont représentés par deux châteaux de l'AOC Graves (M et J avec 3 et 10 isolats respectivement) et par un château de l'AOC Pessac-Léognan (C, 23 isolats). Le Médoc est représenté par un château de l'AOC Margaux (F, 185 isolats) et trois châteaux de l'AOC Pauillac (D, E et G avec 17, 85 et 355 isolats respectivement). Les camemberts représentent la proportion d'isolats de chaque groupe génétique dans chaque château.

5 Etude de cas à l'échelle d'un château

Nous avons étudié les caractéristiques des populations à l'échelle du château G. Dans ce château, 355 individus ont été isolés pendant l'élevage à partir de nombreux échantillons provenant de plusieurs lots et de plusieurs millésimes ; puis, ils ont été génotypés.

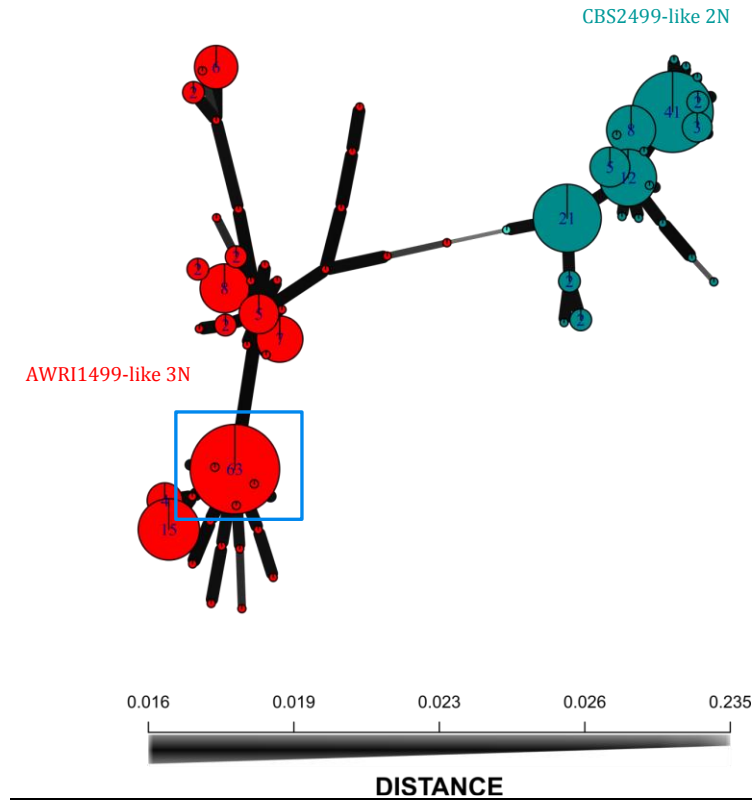


Figure 37: Spanning tree représentant les liens entre les souches du château G.

Sont représentés les 355 isolats génotypés du château G, tous millésimes confondus. 84 génotypes ont été identifiés. Les souches génotypées sont regroupées en deux sous-populations : les isolats triploïdes AWRI1499-like (rouge) et les isolats diploïdes 2499-like (bleu). Un point correspond à un génotype. La taille d'un point est proportionnelle au nombre d'individus partageant le génotype.

La [Figure 37](#) montre que des isolats des groupes diploïde CBS2499 (133 individus) et triploïde AWRI1499 (222 individus) coexistent dans le château G. Les 355 isolats sont répartis en 84 génotypes ; certains génotypes sont donc partagés par un nombre conséquent d'individus. Dans l'exemple encadré en bleu sur la [Figure 37](#), 63 individus du groupe triploïde 1499-like partagent un même génotype. Il en est de même pour les individus du groupe diploïde 2499-like. La population dans le château G est donc en partie clonale. Ceci est en partie lié au fait que certains clones ont été isolés d'un même échantillon. L'analyse du minimum spanning tree ([Figure 37](#)) suggère que les génotypes du groupe AWRI1499-like sont globalement plus distants génétiquement que ceux du groupe CBS499-like, phénomène également observé sur la population globale des isolats du vin ([Figure 26](#)).

> A l'échelle d'un millésime

Trois lots de vin du millésime 2013 : X, Y et Z, en cours d'élevage en barrique ont été échantillonnés lors des mois d'Octobre, Novembre et Décembre 2014, toujours dans le château G. Pour chaque lot, plusieurs barriques positionnées à différents endroits du chai ont été suivies sur les trois mois: 6 pour X, 5 pour Y et 2 pour Z. Pour chaque barrique, plusieurs individus (entre 2 et 18) ont été isolés. Les individus présents dans un lot correspondent à la somme des individus isolés dans chaque barrique de ce lot. Au total, 265 individus ont été isolés et génotypés. Plusieurs populations diploïdes et triploïdes coexistent dans le vin et dans chaque lot comme le montre la Figure 38. Certains génotypes sont communs aux 3 lots tels que le génotype encadré en bleu. Dans l'ensemble, 22% des génotypes identifiés sont retrouvés dans au moins deux lots. Ces génotypes partagés rassemblent 71% des individus collectés sur l'ensemble des échantillons confirmant la présence de génotypes très représentés dans nos trois lots. Ceci est à pondérer par le fait que certains clones proviennent du même échantillon.

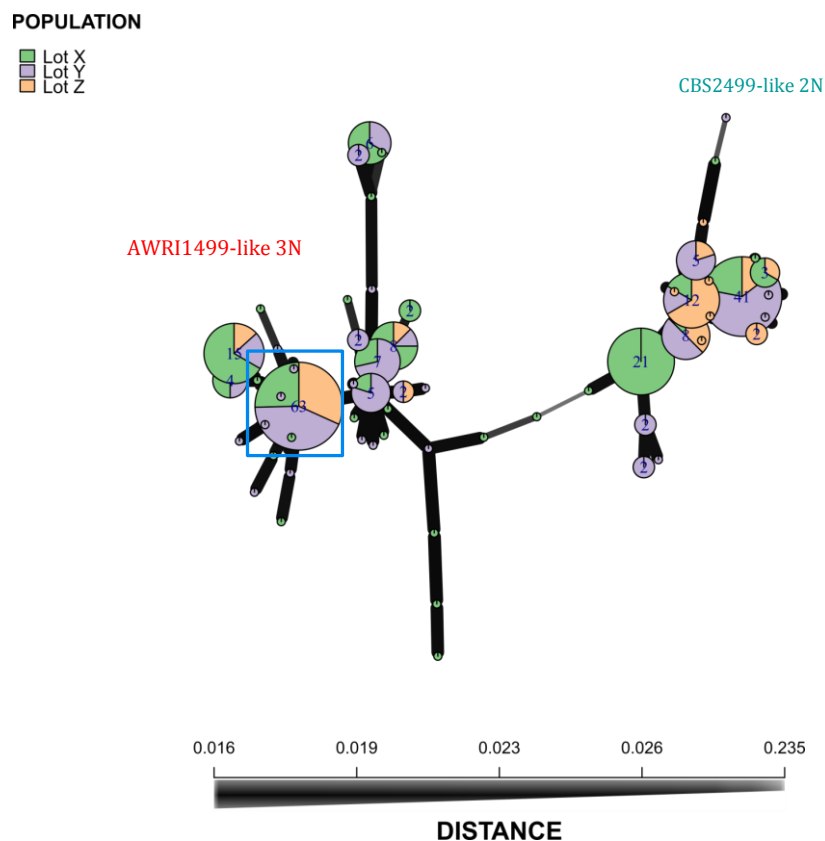


Figure 38: Distribution des individus isolés dans trois lots de vin en élevage au cours de millésime 2013.

Sont représentés 265 individus répartis en 66 génotypes. L'encadré bleu représente un génotype commun aux trois lots.

> A l'échelle d'un lot : persistance des individus

L'étude de la répartition des génotypes au cours des trois mois échantillonnés montre que pour les trois lots, 15 à 17% des génotypes identifiés sont retrouvés sur au moins deux mois. Prenons l'exemple du lot X (107 isolats, Figure 39). Six barriques de ce lot ont été suivies sur les trois mois et les populations en *B. bruxellensis* déterminées sur milieu gélosé se situaient entre 0 10² UFC/mL. Des isolats ont été collectés et une partie d'entre eux ont été génotypés.

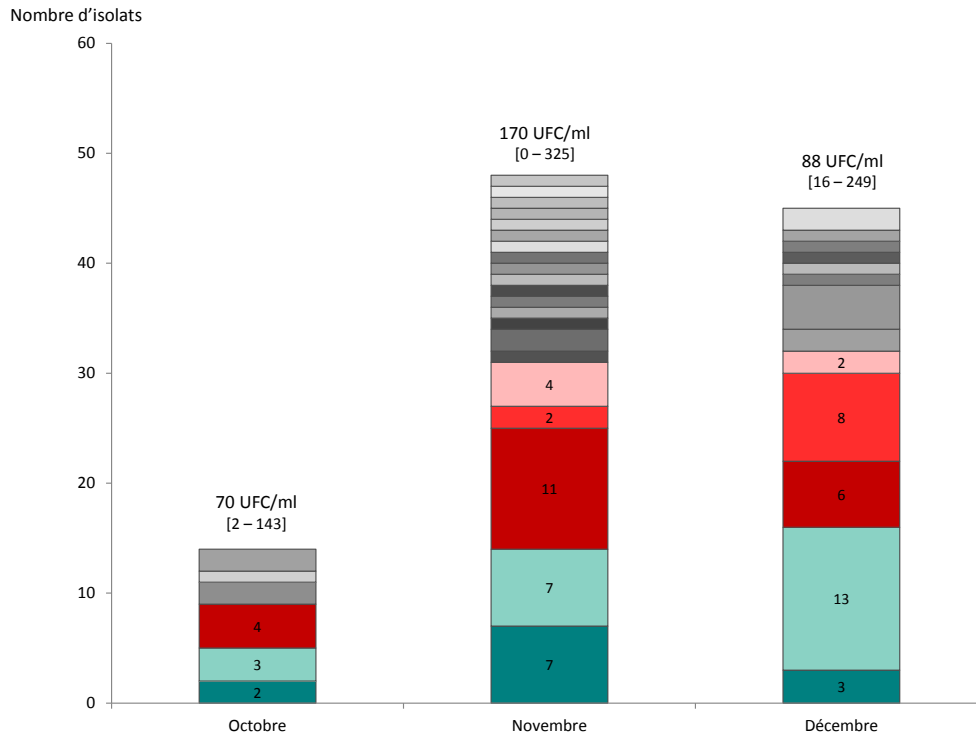


Figure 39 : Distribution des isolats dans les génotypes identifiés dans le lot X de vin en élevage au mois d'Octobre, Novembre et Décembre 2014.

Les niveaux de population moyens obtenus sur boîte sont indiqués pour chaque mois en UFC/mL (min et max dans l'intervalle). Pour chaque groupe génétique, sont représentés en couleur les génotypes retrouvés sur au moins deux mois (niveau de vert : génotypes diploïdes, niveau de rouge : génotypes triploïdes). En gris sont représentés les génotypes spécifiquement retrouvés lors d'un mois.

Les 107 isolats se répartissent en 32 génotypes. Cinq d'entre eux ont été isolés sur au moins deux mois et 68% des individus appartiennent à ces génotypes. Cela est en partie dû à l'isolement de plusieurs clones dans un échantillon. Ceux-ci semblent donc particulièrement adaptés à ce vin. Comme dans le lot X, la nature des individus isolés évolue au cours des 3 mois d'élevage dans les lots Y et Z, mais aucun profil général d'évolution au profit d'un groupe génétique qui prendrait le dessus sur l'autre n'a pu être mis en évidence.

6 Discussion

Les analyses présentées dans ce chapitre et réalisées sur un très grand nombre d'individus confirment l'importante diversité génétique de l'espèce *B. bruxellensis* dans le vin, déjà suggéré par les études moins vastes de Conterno *et al.* (2006), Vigentini *et al.* (2012) et Albertin *et al.* (2014). Sur les 1318 individus du vin, 543 génotypes ont été identifiés et les souches se répartissent dans 5 groupes génétiques. Comme décrit par Avramova *et al.*, cette structuration est associée au niveau de ploïdie (diploïde ou triploïde) des individus. Les isolats étudiés sont hétérozygotes pour au moins un des 12 locus microsatellites amplifiés, excluant une organisation haploïde du génome (Avramova *et al.*, soumis ; Hellborg et Piskur, 2009). Contrairement à *S. cerevisiae*, la formation de spores par *B. bruxellensis* n'a à notre connaissance été rapportée qu'une seule fois (van der Walt et van Kerken, 1960). Ainsi, dans le cas d'un mode de reproduction sexué rare ou non-existant, la présence d'une importante proportion d'individus hétérozygotes pourrait être associée à une diversité phénotypique importante, générée pour améliorer l'adaptation aux environnements colonisés (Avramova *et al.*, soumis).

En accord avec de précédentes études (Curtin *et al.*, 2007 ; Campolongo *et al.*, 2010 ; Vigentini *et al.*, 2012), plusieurs groupes génétiques présentant différents niveaux de ploïdie coexistent dans chaque pays ou régions viti-vinicoles, château et lot étudiés. Aucun groupe génétique n'est associé à une zone géographique principale ou unique. Si 33% des individus présentent un génotype spécifique, 67% d'entre eux se répartissent dans 108 groupes de clones (rassemblant de 2 à 171 individus). Sur les 108 groupes de clones identifiés, 47 % rassemblent des individus isolés dans au moins deux zones géographiques distinctes suggérant des phénomènes de dissémination des individus, à l'échelle de la région viticole du pays et même du globe. Ceci confirme les hypothèses émises par Avramova *et al.* (soumis) qui indiquent que l'impact de la zone géographique sur la diversité génétique et le regroupement des individus était nettement moins important pour les isolats du vin (3,7% de la variance) que pour les individus non isolés du vin (54,8% de la variance totale). Le vin est un produit élaboré, puis distribué et consommé dans le monde entier, ce qui pourrait donner lieu à des échanges de souches. Un phénomène de dispersion similaire a été mis en évidence pour le pathogène de la vigne *Daktulosphaira vitifoliae* connu sous le nom de phylloxéra. Vers la moitié du 19^e siècle, cet insecte fut accidentellement importé d'Amérique du Nord, dont il est natif, en France avant d'être dispersé en Europe (Vorwerk et Forneck, 2006). Cette dispersion a provoqué la destruction rapide des vignobles, non résistants à ce pathogène et l'effondrement de l'économie du vin (Powell, 2008). Chez *S. cerevisiae*, également associée aux environnements fermentaires issus de l'activité humaine, l'origine géographique contribue de manière plus importante à la variabilité génétique (28%) que chez *B. bruxellensis* (5%) (Legras *et al.*, 2007 ; Avramova *et al.*, soumis). Néanmoins, s'il

existe des populations spécifiques de certaines zones géographiques, l'analyse génotypique des souches de *S. cerevisiae* de vin montre qu'à l'instar de *B. bruxellensis* certains génotypes sont largement dispersés dans le monde (Legras *et al.*, 2007).

D'autres phénomènes que le commerce du vin pourraient également favoriser la dissémination de l'espèce. Les levures, notamment non sporulantes, telles que *B. bruxellensis* ne sont pas ou peu capables de déplacements indépendants (air) (Koufopanou *et al.*, 2013). Contrairement à *S. cerevisiae* (Goddard *et al.*, 2010), *B. bruxellensis* n'a pas été isolée dans des environnements dits naturels (sols, écorces...) autour du vignoble. En revanche, elle a, dans de rares occasions, été isolée de raisins (Guerzoni et Marchetti, 1987 ; Renouf et Lonvaud-Funel, 2006 ; Barbin, 2006). Néanmoins, après le vin, l'habitat privilégié de cette levure est le chai (Fugelsang, 1998 ; Connel *et al.*, 2002). Ceci est confirmé par le pourcentage important de clones colocalisés (isolés dans un même château) en lien avec la persistance de certains génotypes sur des périodes d'au moins 25 ans. L'achat et les échanges de raisins pourraient donc conduire à la dispersion de l'espèce au niveau loco-régional (5 à 20 km) principalement. La dispersion entre deux chais ou deux champs de vigne pourrait aussi reposer aussi sur les insectes (abeilles, mouches...), vecteurs connus pour le transport des levures à l'échelle locale (<10km) (Lachance, 2013). Goddard a notamment montré que les abeilles étaient un vecteur de *S. cerevisiae* dans le vignoble en Nouvelle-Zélande (Goddard *et al.*, 2010). *Drosophila melanogaster* est un vecteur de transport connu de *B. bruxellensis* (Martorell *et al.*, 2006) et la production de phénols volatils a récemment été proposée comme une stratégie d'attraction de l'insecte utilisé par *B. bruxellensis* pour son transport (Dweck *et al.*, 2015).

Les phénomènes de dispersion supérieurs à 20km ne sont généralement pas associés à des mécanismes dits naturels (insectes, vents...). Outre le commerce du vin, ils pourraient être associés aux échanges de matériel de vinification. L'export et l'utilisation de barriques usagées et reconditionnées pour l'élevage des vins, pratique fréquente en vinification, pourraient favoriser la dispersion. En Nouvelle-Zélande, malgré des populations de *S. cerevisiae* majoritairement région-spécifique, Goddard (2010) a montré qu'un des génotypes dominants pendant la fermentation était génétiquement proche de souches isolées de barriques provenant de France, suggérant la dispersion de *S. cerevisiae* à large échelle par le biais des barriques de chêne. Néanmoins, selon Renouf *et al.* (2005), sous réserve d'une hygiène rigoureuse des barriques, l'utilisation de barriques neuves ou usagées n'influencerait pas la population microbienne des vins en élevage. Les mécanismes à l'origine de cette dispersion observée restent donc à élucider.

Polyplôidie et dispersion

Comme le montrent Avramova *et al.* sur l'ensemble de la population, l'état polyplôide est également largement répandu parmi les isolats de vin et est présent dans tous les pays échantillonnés. En région bordelaise comme ailleurs dans le monde, les groupes CBS2499-like et AWRI1499-like sont majoritaires. Les groupes de clones du groupe diploïde CBS2499-like, présents dans tous les pays échantillonnés, sont plus largement dispersés. En effet, malgré leur présence dans la majorité des pays, les profils alléliques des groupes triploïdes AWRI1608-like et AWRI1499-like apparaissent plus spécifiques des châteaux et pays étudiés. Ceci pourrait refléter une stabilité plus importante des individus diploïdes comme chez les levures du genre *Saccharomyces* (Gerstein *et al.*, 2008 ; Marsit *et al.*, 2017). Les phénomènes de modifications génomiques sont en effet plus fréquents chez les levures polyplôides (Mayer et Aguilera, 1990 ; Albertin et Marullo, 2012, Marsit *et al.*, 2017). L'état polyplôide présente par ailleurs un surcoût énergétique pour la cellule en ce qui concerne la synthèse d'ADN, la répartition des chromosomes pendant la division cellulaire et l'élargissement du nucléus et de la cellule notamment (Comai *et al.*, 2005 ; Albertin et Marullo, 2012). Néanmoins, la formation de polyplôides stables a été répertoriée chez de nombreux eucaryotes végétaux ou animaux (Ramsey *et al.*, 1998; Gregory et Mable, 2005 ; Diallo, 2015) et chez plusieurs espèces de champignons (Albertin et Marullo, 2012). En effet, l'aneuploïdie et la polyplôidie contribuent à la plasticité du génome. En conséquence, leur maintien pourrait conférer des avantages adaptatifs aux levures dans des conditions difficiles telles que des concentrations importantes en antibiotiques, des environnements limités en substrats ou autres (Comai *et al.*, 2005 ; Albertin et Marullo, 2012 ; Mulla *et al.*, 2014). Chez *B. bruxellensis*, les travaux de Curtin *et al.*, 2012, puis d'Avramova *et al.* (soumis) ont montré que les individus des groupes triploïdes AWRI1499-like et L0308-like étaient bien plus tolérants aux sulfites que ceux des autres groupes génétiques. Les sulfites sont largement utilisés dans le vin comme agent antiseptique pour limiter les risques de contamination notamment par les levures d'altération telles que *B. bruxellensis*. La dispersion rapide (30 ans) et le maintien des individus triploïdes du groupe AWRI1499-like dans les vins du monde entier renforce l'hypothèse du rôle de la polyplôidie à l'adaptation de *B. bruxellensis* aux conditions de stress en présence de sulfites. L'étude plus approfondie des réarrangements génomiques et du niveau de ploïdie de l'espèce *B. bruxellensis* permettra d'élucider les mécanismes d'adaptation de cette espèce à son environnement.

Dans le vignoble bordelais, les individus isolés avant 1990 appartiennent exclusivement au groupe diploïde CBS2499-like, ce qui confirme les observations d'Albertin *et al.* (2014) à ce sujet. Plusieurs hypothèses sont à considérer pour expliquer ce phénomène. La part de SO₂ actif diminuant considérablement au cours du vieillissement en bouteille, il est possible qu'en l'absence

de pressions de sélection et dans un milieu extrêmement appauvri en nutriments, les levures triploïdes, possiblement plus exigeantes du point de vue maintien énergétique, laisseraient la place aux diploïdes qui deviendraient alors dominantes. Une seconde explication pourrait être méthodologique et liée à la difficulté de remettre en culture les levures à partir des vieux millésimes. Les individus triploïdes pourraient y être, du fait de la rareté des nutriments, à l'état viable et non cultivable (Serpaggi *et al.*, 2012, Longin *et al.*, 2016 ; Capozzi *et al.*, 2016). La mise en évidence des individus triploïdes à partir des années 90 pourrait enfin refléter réellement leur émergence récente, notamment dans le vignoble bordelais. La plus large distribution des individus diploïdes (présents partout), la clonalité importante de la population triploïde comparée à celle de la population CBS2499-like vont dans le sens de cette dernière hypothèse. Néanmoins, la forte capacité évolutive des levures polyploïdes (mentionnée ci-dessus) pourrait également expliquer l'émergence de génotypes spécifiques de châteaux, millésimes ou lots, et pourrait amener les populations triploïdes à devenir dominantes dans un futur assez proche.

Bien que l'ajout des sulfites dans le vin soit pratiqué par les hommes depuis plusieurs centaines voire milliers d'années (Romano et Suzzi, 1993), Curtin *et al.* (2012) suggéraient que l'émergence de populations triploïdes résistantes en Australie dans les années 2000 faisait suite à l'utilisation peu contrôlée (et massive) des sulfites. Chez *S. cerevisiae*, la tolérance accrue aux sulfites est associée à un évènement de translocation aboutissant à la surexpression de la pompe à sulfite SSU1 (Pérez-Ortin *et al.*, 2002). Ce phénomène rappelle l'émergence des bactéries et levures résistantes aux antibiotiques. Chez les champignons pathogènes, l'aneuploïdie est largement connue pour être associées à des phénomènes de résistance aux antibiotiques et à une augmentation de la pathogénicité (Polakova *et al.*, 2009 ; Sionov *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2011 ; Silva *et al.*, 2012 ; Mulla *et al.*, 2014). Les activités humaines, l'utilisation du SO₂ pourraient donc être en partie responsables de l'émergence, de la sélection et de l'adaptation de certains groupes triploïdes dans le vin. L'adaptation de *B. bruxellensis*, espèce naturellement présente dans le vin à ce milieu pourrait donc avoir été influencée par l'intervention humaine dans son élaboration.

Chapitre 2

*Diversité phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* : métabolisme carboné et production de phénols volatils.*

Influence du groupe génétique et de l'origine écologique.

La variabilité génétique importante de l'espèce *B. bruxellensis* pourrait être associée à des mécanismes d'adaptation et de survie. De plus, la prédominance de certains profils génétiques dans certains milieux suggère l'adaptation des individus aux environnements dont ils sont issus et la sélection de certains d'entre eux. Un lien entre la tolérance aux sulfites de certaines souches et leur groupe génétique d'appartenance a en effet été décrit récemment (Curtin *et al.*, 2012 ; Avramova *et al.*, soumis). D'autres éléments pourraient également moduler les capacités d'altération des souches : tolérance aux bas pH, tolérance à l'alcool, capacité à utiliser les substrats présents dans le vin pour soutenir leur croissance, mais également rendements de croissance ou vitesse de synthèse des phénols volatils.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'influence du groupe génétique et de la matrice d'isolement sur la capacité à utiliser les substrats carbonés présents dans le milieu et sur la capacité de production de phénols volatils. Afin de bien maîtriser tous les éléments composant le milieu, les expérimentations ont été menées en milieu et condition de croissance modèles. Nous verrons qu'il n'est pas aisé de trouver un milieu et des conditions de croissances adaptés à toutes les souches. Des essais ont également été conduits dans le vin, mais seront présentés dans le chapitre suivant.

1 Diversité génétique et utilisation des sucres

Plusieurs études menées depuis 2006 ont montré que les levures de l'espèce *B. bruxellensis* pouvaient utiliser un large panel de sources carbonées (Conterno *et al.*, 2006 ; Galafassi *et al.*, 2011 ; Leite *et al.*, 2013 ; Crauwels *et al.*, 2015). Des études récentes menées par Crauwels *et al.* (2015 et 2017) ont également mis en évidence un lien entre la matrice d'origine et la consommation de certains substrats carbonés et azotés, sous-tendu par des signatures génétiques (délétions notamment). Néanmoins, aucune de ces études ne portait sur un panel de souche suffisamment représentatif de la très large diversité génétique de l'espèce.

Nous avons dans un premier temps, étudié la croissance d'un panel important de souches (46) sur des mono, disaccharides et polyalcools (16) retrouvés dans les boissons fermentées. Les résultats ont été analysés et interprétés en fonction des facteurs groupe génétique et matrice d'origine. Une seconde étude a été menée sur 8 de ces 46 souches sur un panel plus large de sources carbonées (190). Enfin, les performances de croissance (vitesses, rendements, phase de latence) de 2 souches des deux principaux groupes génétiques retrouvés dans le vin (CBS2499-like et AWRI1499-like) ont été comparées en présence de certains sucres, seuls ou en mélange.

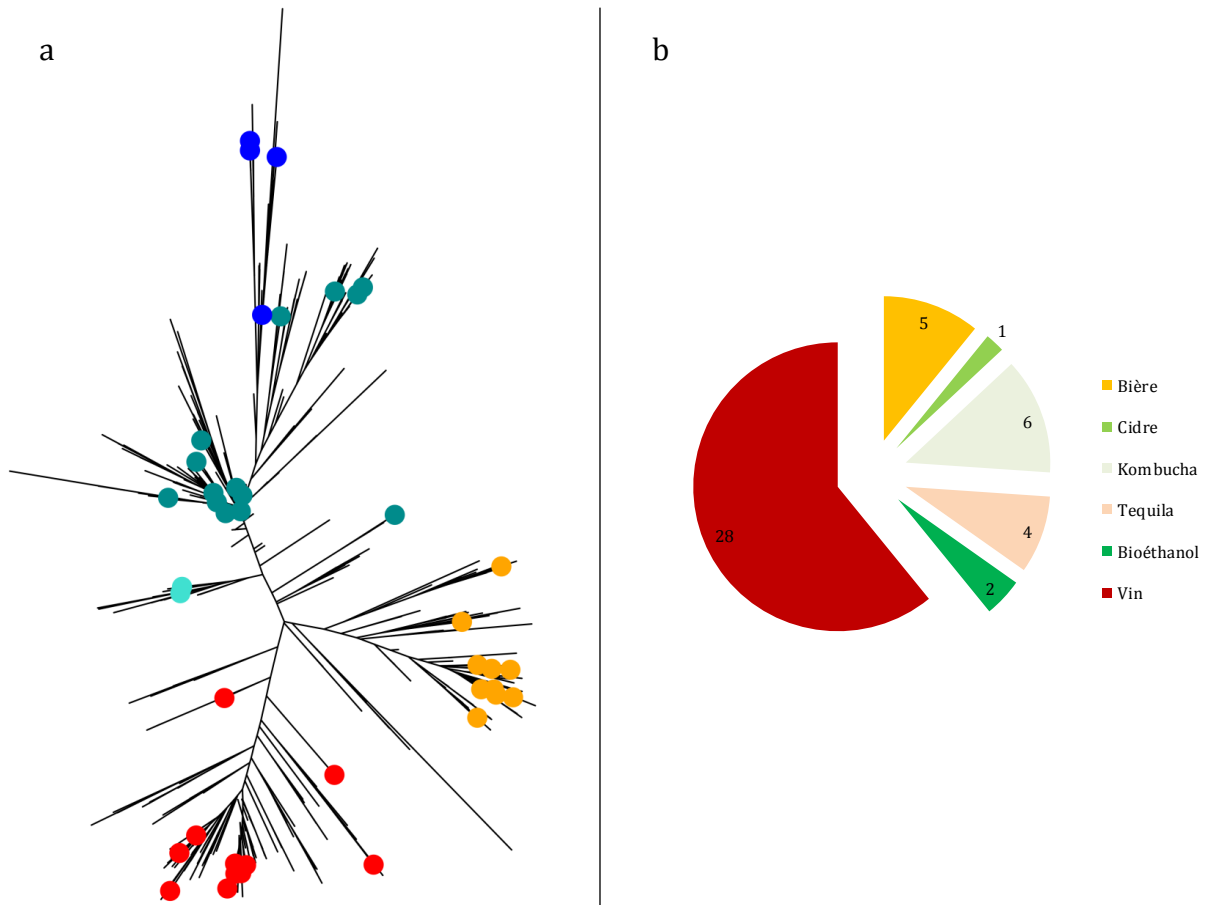


Figure 40 : Caractéristiques des 46 souches phénotypées en « nanofermenteur ». En a : position des groupes génétiques ; en b : origine écologique.

1.1 Profils de croissance et d'utilisation des sucres en « nanofermenteur »

La première étape de cette étude a consisté à déterminer les capacités de consommation vis-à-vis de 16 sources carbonées (monosaccharides, disaccharides et polyalcools) communément utilisées pour le phénotypage des microorganismes. Un panel de 46 souches de *B. bruxellensis* a été retenu (Figure 40, Annexe 2). Celles-ci ont été isolées à partir de différentes matrices fermentées (bière, bioéthanol, cidre, kombucha, téquila, vin) et au moins deux représentants de chacun des 6 groupes génétiques définis précédemment ont été inclus (Figure 40).

Le choix du milieu et de la méthode de phénotypage ont nécessité de nombreux essais : nous avons tout d'abord travaillé en milieu solide sur différents milieux, mais obtenu de trop nombreux « faux positifs » (formation de colonies en l'absence totale de substrat carboné). En effet, certaines souches de *B. bruxellensis* présentent une croissance, parfois importante, sur milieu YNB sans acides aminés gélosé ou liquide. Nous avons également observé que certaines souches présentaient la capacité de se multiplier sur agar seul (quel que soit son degré de pureté) comme l'observait Galafassi (2011). Il est possible que les levures soient capables d'utiliser des réserves élaborées pendant les phases de préculture en milieu riche, même si les formes de réserve ne sont pas connues pour l'espèce (Leite *et al.*, 2016). En conséquence, les expériences de phénotypage ont été menées sur un milieu minimum défini (Heresztyn, 1986b ; Conterno *et al.*, 2006), liquide, dans des conditions proches de celles des milieux fermentés tels que le vin et le bioéthanol, i.e. pH 3,5, sans apport d'oxygène dans le milieu. La croissance a été définie comme une augmentation significative de la turbidité et la consommation de substrat a été validée par dosage dans certains cas. Des croissances jusqu'à absorbance 0,4 (contre moins de 0,15 à l'inoculation) ont été observées dans de certains cas dits « faux positifs » (pas de consommation de substrat) et ne sont pas représentées ici.

1.1.1 Profils de consommation

Le détail des résultats obtenus, souche par souche, est présenté en annexe 10. Le tableau 19 synthétise ces résultats.

Tableau 19 : Résumé des profils d'utilisation de substrat carbonés après phénotypage de 46 souches de *B. bruxellensis*.

Les valeurs moyennes et les écart-types (entre parenthèse) des vitesses spécifiques de croissance et les phases de latence médianes, minimales et maximales sont représentées. ND : non déterminé, car pas ou trop peu de souches présentant le phénotype.

	Nombre d'isolats	% d'isolats	Vitesse spécifique maximale de croissance (jour ⁻¹)	Phase de latence (jour)
Monosaccharides				
C6				
D-glucose	46	100	0,71 (±0,36)	1 (1-32)
D-mannose	44	96	0,63 (±0,34)	1 (1-26)
D-fructose	42	91	0,64 (±0,36)	1 (1-28)
D-galactose	40	87	0,60 (±0,30)	1 (1-44)
C5				
D-ribose	34	74	0,41 (±0,18)	6 (1-36)
L-arabinose	1	2	ND	ND
D-xylose	1	2	ND	ND
D-rhamnose	0	0	ND	ND
Disaccharides				
Saccharose	45	98	0,73 (±0,38)	1 (1-19)
Maltose	43	93	0,67 (±0,33)	1 (1-39)
Tréhalose	42	91	0,67 (±0,34)	1 (1-29)
Cellobiose	39	85	0,64 (±0,34)	1(1-51)
Lactose	1	2	ND	ND
Mélibiose	0	0	ND	ND
Polyols				
Sorbitol	5	11	0,22 (±0,069)	41 (38-44)
Mannitol	1	2	ND	ND

Les sucres majoritairement consommés sont les hexoses (glucose, mannose, fructose, galactose), le D-ribose, le saccharose, le maltose, le tréhalose et le cellobiose, en accord avec les résultats de Conterno *et al.* (2006) et de Crauwels *et al.* (2015). Le L-arabinose, D-xylose, D-rhamnose ainsi que le lactose, le mélibiose et les polyalcools sont peu voire pas consommés par les souches étudiées. Néanmoins, certaines d'entre elles présentaient une faible croissance (Absorbance maximale : 0,4) sur certains de ces sucres, sans qu'il y ait production de métabolites secondaires tels que l'éthanol ou l'acide acétique suggérant leur utilisation par un métabolisme strictement respiratoire.

1.1.2 Profils de croissance

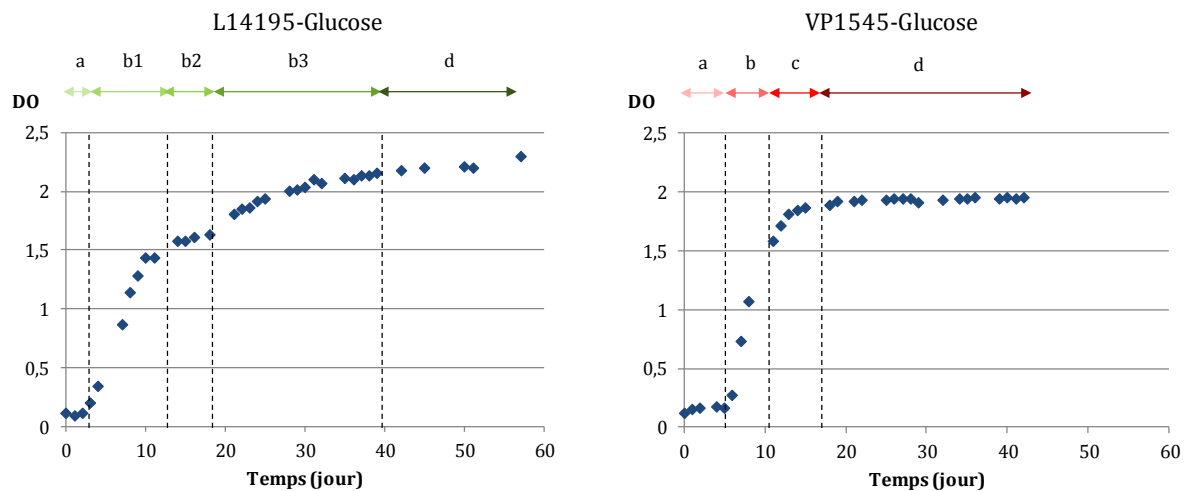


Figure 41: Exemples de profils de croissance : souches L14195 et VP1545 en présence de glucose sur milieu minimum en « nanofermenteur ».

Les différentes phases de la croissance ont été déterminées ainsi : a= phase de latence, b= phase de croissance, c= phase de ralentissement, d= phase stationnaire. La souche L14195 présente deux phases de croissance, b1 et b3, séparés d'une phase de « latence » b2.

Pour chaque sucre, les paramètres de croissance varient en fonction des individus ([Tableau 19](#)). Ainsi, si une majorité d'individus présentent une phase de latence d'environ 1 jour en présence de glucose, pour certains, la croissance (augmentation de la DO) n'a débuté qu'après 32 jours de culture. Des phénomènes de variation similaires sont observés sur les autres sucres ([Tableau 19](#)).

Dans les conditions de croissance imposées par le milieu pauvre et la limitation en oxygène du « nanofermenteur », les souches présentent des profils de croissance variés ([Figure 41](#)). Ces profils varient en fonction des souches et pour une même souche, en fonction des sucres. Les variations entre les profils de croissance ne sont pas fonction du groupe génétique ou de la matrice d'origine des individus. Certaines souches présentent une croissance de type exponentielle : exemple de la souche VP1545 en présence de glucose, après une phase de latence (croissance lente), ([Figure 41](#)). D'autres, comme la souche L14195 ([Figure 41](#)) ont une croissance en deux phases : une première phase à croissance rapide et une seconde, plus lente. Ces deux phases sont séparées par une phase de fort ralentissement de la croissance (DO stable pendant 4-5 jours consécutifs) suggérant une modification et/ou une limitation du métabolisme. Les concentrations en sucres et la production de métabolites secondaires n'ont pas pu être suivies dans les conditions de l'expérience. Néanmoins, en supposant que les concentrations en substrats sont non limitantes, il est possible que, lors de la première phase, la levure consomme l'oxygène présent. Dans un second temps, la diminution de la quantité d'oxygène disponible voire sa disparition peut

conduire à une diminution de la vitesse de croissance (en accord avec Aguilar-Uscanga *et al.* (2003), Blomqvist *et al.* (2012), et Capusoni *et al.* (2016) ou bien à une inhibition transitoire de la croissance suivie d'une reprise à des vitesses plus faibles (Effet Custer). L'ajout d'accepteur d'électrons tels que l'acétoïne (Scheffers, 1966), l'ergostérol ou le Tween 80 (Rozpedowska *et al.*, 2011), en rétablissant la balance oxydo-réduction, permettrait de limiter l'effet du manque d'oxygène sur la croissance.

Sur les sucres majoritairement consommés, les souches présentent en moyenne des vitesses spécifiques maximales (μ_{\max}) de croissance proches de $0,70 \text{ jour}^{-1}$, des phases de latence de 1 jour (Tableau 19) et des DO maximales de l'ordre de 2 unités d'absorbance (non représentées). Dans un milieu proche de celui utilisé ici (Glucose : 30 au lieu de 20g/l, $\text{NH}_4(\text{SO}_2)_4$: 7,5 au lieu de 2g/l) et sans apport d'oxygène, Blomqvist rapportait, pour CBS11270, une vitesse spécifique de croissance de $0,076 \text{ h}^{-1}$ ($1,8 \text{ jour}^{-1}$). Certaines souches, telles que CBS2499, ont présenté un μ_{\max} similaire ($1,7 \text{ jour}^{-1}$). En présence de ribose, les phases de latence sont plus longues (valeur médiane : 6 jours) et les vitesses spécifiques de croissance inférieures ($0,40 \text{ j}^{-1}$). De même, les souches présentant une croissance sur sorbitol, présentent des vitesses de croissance et des absorbances maximales moins importantes ($0,22 \text{ j}^{-1}$ et 1,1 unité d'absorbance) et des phases de latence plus longues (41 jours). Néanmoins, les vitesses spécifiques maximales de croissance, peuvent varier entre les réplicats. Ainsi les réplicats a, b et c de la souche UWOPS 92-255.4 présentent respectivement des vitesses de $0,42$, $1,39$ et $0,95 \text{ j}^{-1}$ en présence de glucose. L'état de la préculture, le niveau d'agitation du nanofermenteur, ou des petites différences de taux d'inoculation pourraient être en cause.

Si l'on raisonne en mode binaire (croissance/non croissance), les profils de consommation sont remarquablement similaires quelle que soit la souche considérée, sa matrice d'origine, son groupe génétique d'appartenance et donc son niveau de ploïdie. Les capacités de métabolisation du ribose pourraient faire exception puisque 7 des 12 individus « ribose négatifs » appartiennent au groupe diploïde CBS2499-like (Figure 42, Annexe 10). Les caractéristiques de croissance (latence, μ_{\max} , absorbance maximale) des souches phénotypées en conditions limitantes en oxygène ne sont pas, elles non plus, liées à la matrice d'origine, ou au groupe génétique d'appartenance des souches (voir Figure 42 pour le taux de croissance).

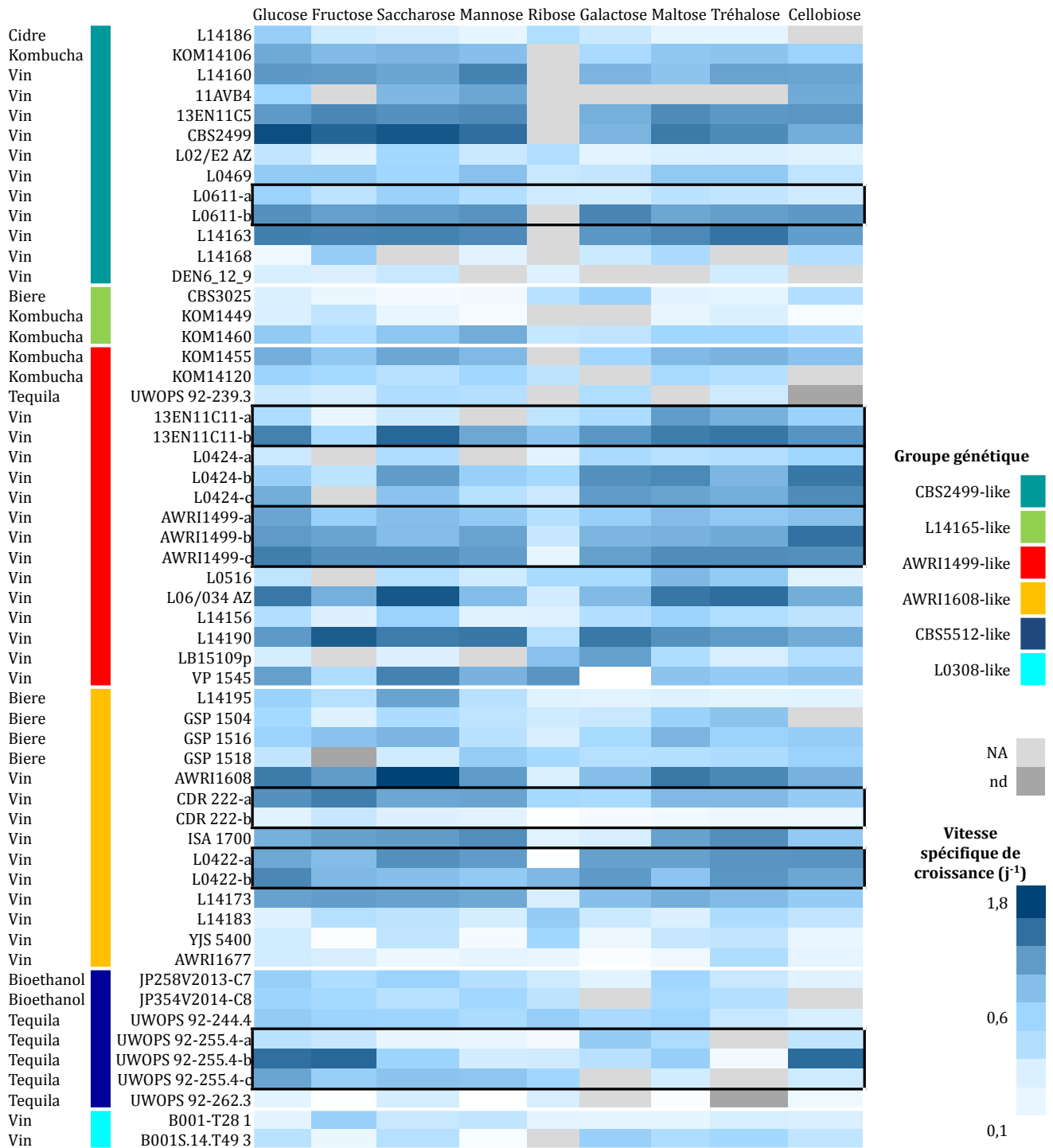


Figure 42 : Distribution des vitesses spécifiques maximales de croissance (μ_{max}) de 46 souches de *B. bruxellensis* en fonction du substrat carboné.

Les résultats des souches pour lesquelles les réplicats ne donnaient pas les mêmes résultats sont encadrés en noir. NA : absence de croissance, nd : absence de donnée.

1.1.3 Conclusion

Nos travaux en « nanofermenteurs », sans apport d'oxygène et en milieu défini mettent en évidence :

- la consommation d'un nombre important de sources carbonées par la plupart des souches étudiées.
- les profils de consommation sont similaires entre les souches. Elles sont capables d'utiliser les sucres majoritairement présents dans les boissons fermentées (hexoses, D-ribose, saccharose, maltose, tréhalose et cellobiose). Elles ne présentent en général pas de croissance sur le L-arabinose, le L-xylose, le L-rhamnose, le lactose, le mélibiose et les polyalcools.
- les profils et les caractéristiques de croissance varient en fonction de l'individu, de son état physiologique et du sucre en présence, mais ces variations ne sont pas fonction du niveau de ploïdie et de la matrice d'origine de la souche. Nos résultats montrent par ailleurs que pour une souche donnée, tous les substrats carbonés ne permettent pas des croissances aussi efficaces (exemple du ribose). Ces différences pourraient être liées à des mécanismes de transport moins efficaces pour les sucres conduisant à des croissances plus lentes ou à une plus grande sensibilité/dépendance vis-à-vis de l'oxygène en présence de certains sucres, qui pénaliseraient la croissance dans les conditions de l'expérience.

1.2 Profil d'utilisation d'un large panel de sources carbonées sur plaque Biolog

Afin d'étudier les profils d'utilisation sur un nombre plus important de substrats, nous avons testé la capacité de 8 souches à métaboliser 190 substrats carbonés sur des plaques commercialisées par Biolog (PM1 et PM2) ([Figure 43, p130, Annexe 2](#)). L'intensité du changement colorimétrique (appelé signal positif) peut varier d'un facteur 10 en fonction du substrat et de la souche considérée. En conséquence, ce paramètre a également été pris en compte dans l'analyse des données.

Sur les 190 substrats carbonés testés, une valeur binaire (0 : absence d'oxydation ; 1 : oxydation) a été attribuée à 108 des sources (pour lesquelles, les deux réplicats de chaque souche ont donné des résultats identiques). Parmi ces 108 sources, 12% ont été oxydées par toutes les souches, 15% par au moins une souche et 73% n'ont pas été métabolisées.

Les souches de l'espèce *B. bruxellensis* utiliseraient donc seulement une petite partie des substrats proposés par ce test. Néanmoins, tous ne présentent pas un intérêt vis-à-vis de l'adaptation aux milieux fermentés et en particulier au vin. La majorité des souches donne un

résultat positif en présence des aldoses (7/10 « oxydés » par toutes les souches) (Figure 44). Les signaux obtenus en présence d'osides (holosides ou hétérosides) différencient plus les souches. Aucun des di- et trisaccharides testés ne fait l'unanimité parmi les souches étudiées, notamment, parce que la souche UWOPS 92-255.4, isolée de la tequila, n'est peu ou pas capable d'utiliser les α et β -glyco et galactosides ainsi que les monosaccharides α et β substitués (Arbutin, α et β glyco et galactosides) dans les conditions de l'expérience. Lorsque métabolisés, le D-cellobiose, le gentiobiose, le maltose et le saccharose sont associés à un signal important. L'intensité du signal obtenu est plus variable en présence de palatinose, de tréhalose, de turanose, de maltotriose et de melezitose. Il est, en effet, 10 fois moins important pour les deux souches triploïdes AWRI1499-like. De faibles signaux sont également obtenus en présence de lactulose, de lactose et de mélibiose pour certaines souches. Des signaux assez faibles sont également mis en évidence chez une partie des souches en présence de polysaccharides tels que les dextrans, la laminarine et la pectine. A l'exception de l' α -méthyl-D-mannoside, les saccharides substitués ou hétérosides donnent un signal positif pour au moins une souche. De manière intéressante, les souches du groupe AWRI1608-like métabolisent toutes (avec une intensité importante) les monosaccharides α et β substitués (amygdalin, arbutine, α et β -méthyl-glucoside). Mais, de manière générale, l'intensité des phénomènes d'oxydation en présence d' α - et β -galactosides (lactulose, lactose, mélibiose) et des monosaccharides substitués α - et β -méthyl-D-galactosides est faible.

D'autre part, la souche de bière CBS3025 n'utilise pas les β -glycosides (cellobiose et gentiobiose), ni les monosaccharides β substitués (arbutin et β -méthyl-D-glucoside). Crauwels *et al.* (2015) avaient observé des phénotypes similaires sur 4 souches de bière analysées sur plaque Biolog et suggéraient que ce résultat pouvait être lié à l'absence d'un gène codant une β -glucosidase (numéro d'accèsion GenBank EIF45415 (AWRI1499)). Nos résultats montrent que cette tendance n'est pas un trait général des souches de bière, puisque la souche de bière GSP1516 présente des capacités importantes à métaboliser ces composés.

Groupe génétique		L14165-like (2n)	CBS2499-like (2n)	CBS5512-like (3n)	AWRI 1608-like		AWRI 1499-like		
Substrat		Bière	Vin	Tequila	Bière	Vin	Vin	Vin	
Sucre		CBS 3025	L0611	UWOPS 92-255.4	GSP 1516	L0422	L14183	L0424	L14190
Aldoses	β-D-Allose	-							
	D-Arabinose	-							
	L-Arabinose	-							
	D-Galactose	-							
	α-D-Glucose	-							
	L-Glucose	-							
	L-Lyxose	-							
	D-Mannose	-							
	D-Ribose	-							
	D-Xylose	-							
Cétose	D-Fructose	-							
	L-Sorbose	-							
	D-Tagatose	-							
Disaccharides	D-Cellobiose	Glc-β(1,4)-Glc							
	Gentiobiose	Glc-β(1,6)-Glc							
	Maltose	Glc-α(1,4)-Glc							
	Palatinose	Glc-α(1,6)-Fru							
	Sucrose	Glc-α(1,2)β-Fru							
	D-Trehalose	Glc-α(1,1)-Glc							
	Turanose	Glc-α(1,3)-Fru							
	Lactulose	Gal-β(1,4)-Fru							
	α-D-Lactose	Gal-β(1,4)-Glc							
	3-0-β-D-Galacto- pyranosyl- D- Arabinose	Gal-β(1,3)-Ara							
	D-Melibiose	Gal-α(1,6)-Glc							
	Tri-saccharides	Maltotriose	Glc-α(1,4)-Glc-α(1,4)-Glc						
D-Melezitose		Glc-α(1,3)-Fru-β(2,1)α-Glc							
D-Raffinose		Gal-α(1,6)-Glc-α(1,2)-Glc							
Polysaccharides	α-Cyclodextrin	[Glc-α(1,4)-Glc] ₃							
	β-Cyclodextrin	[Glc-α(1,4)-Glc] _{3,5}							
	γ-Cyclodextrin	[Glc-α(1,4)-Glc] ₄							
	Dextrin	[Glc-α(1,4;1,6)-Glc] _n							
	Glycogen	[Glc-α(1,4;1,6)-Glc] _n							
	Inulin	Glc-α(1,2)-[Fru-β(2,1)-Fru] _n							
	Laminarin	[Glc-β(1,3;1,6)-Glc] _n							
	Pectin	[GalA6Me-α(1,4)-GalA6Me] _n							
	Stachyose	Gal-α(1,6)-Gal-α(1,6)-Glc-α(1,2)-Fru							
Hétérosides	Amygdalin	Glc-β(1,6)-Glc-(phenyl)acetonitrile							
	Arbutin	Hydroquinone β-D-glucopyranoside							
	Melibionnic Acid	Gal-α(1,6)-GlcA							
	α-Methyl-D- Galactoside	Gal1-α-Me							
	β-Methyl-D- Galactoside	Gal1-β-Me							
	α-Methyl-D-Glucoside	Glc1-α-Me							
	β-Methyl-D- Glucoside	Glc1-β-Me							
	α-Methyl-D- Mannoside	Man1-α-Me							
	Salicin	Glc1-β-2-(hydroxymethyl)phenyl							

Figure 43 : Résultats* du phénotype sur les plaques PM1 et PM2 Biolog de l'oxydation de mono-, di-, tri- et polysaccharides ainsi que d'hétérosides par différentes souches de *B. bruxellensis*.

*Résultat de deux réplicats. Celui-ci est déduit du ratio de l'intensité colorimétrique obtenue sur chaque substrat sur celle du témoin négatif. Lorsque que le ratio est inférieur à 5, le résultat est considéré négatif (rouge), entre 5 et 10: positif d'intensité faible (vert clair), supérieure à 100 : positif, intensité colorimétrique importante (vert foncé), lorsque l'un des réplicats est négatif, le résultat est considéré comme inconnu (orange).

1.3 Comparaison des tests Biolog et « nanofermenteurs »

Des différences en termes de profils de sources carbonées « métabolisées » existent entre les deux tests pour une même souche.

Ainsi, selon le test Biolog, l'ensemble des souches semblent métaboliser le D-xylose et le L-arabinose et dans une moindre mesure le L-rhamnose (en accord avec Crauwels *et al.*, 2015). Pourtant, les tests en « nanofermenteurs », comme les travaux de Conterno (2006) et de Galafassi (2011), montrent que *B. bruxellensis* n'utilise généralement pas ces glucides pour sa croissance. A l'inverse, aucun signal n'est obtenu sur galactose avec la souche CBS3025, contrairement à ce qui était observé lors du test en « nanofermenteur ». Ce phénomène est possiblement lié à l'observation d'un faux positif dans le 1^{er} test ou de faux négatif dans le second. De même, la souche CBS3025 n'utilise pas les β -glycosides (cellobiose et gentiobiose), ni les monosaccharides β substitués (arbutin et β -méthyl-D-glucoside) selon le test Biolog, alors qu'en « nanofermenteur », elle est capable de croître sur cellobiose.

Crauwels *et al.* (2017) observaient également ce genre de différence pour la souche ST05.12/59 sur maltose. Sur plaque Biolog, cette souche n'oxydait pas le maltose et ce phénotype apparaissait corrélé à l'absence d'un gène codant pour une maltase (K01187, malZ; numéro d'accèsion GenBank EIF45413 (AWRI1499)) (Crauwels *et al.*, 2015). Néanmoins, leurs travaux ont par la suite montré que cette souche était capable d'utiliser le maltose en milieu modèle liquide (Crauwels *et al.*, 2017). Plusieurs gènes semblent donc impliqués dans l'assimilation du maltose. Cela pourrait également être le cas pour d'autres substrats.

Il apparaît que les résultats obtenus sur les plaques Biolog sont à interpréter avec précaution. Les différences de réponse observées entre les deux tests pourraient être dues aux concentrations des composés étudiés : « nanofermenteur » : 120-133mM, « Biolog » : 2-20mM). De plus, le test en nanofermenteur mesure une augmentation de la biomasse au cours du temps, alors que le test Biolog mesure l'oxydation d'un composé colorimétrique associé à l'activité mitochondriale, en présence de cellules viables. Or, les capacités de survie importantes de *B. bruxellensis* observées lors de la mise au point des tests en « nanofermenteurs », y compris en l'absence de substrat, suggèrent d'interpréter ce genre de test avec une grande prudence et plus comme un outil comparatif. Il est possible que les souches de *B. bruxellensis* aient la capacité de survivre et de maintenir une activité respiratoire en consommant ses réserves pour produire de l'énergie. Il est également envisageable que ces levures soient capables d'utiliser des traces d'une large gamme de sources carbonées, pour se maintenir, sans être réellement capables de les utiliser pour leur croissance.

Malgré ces réserves, les deux études confirment l'utilisation de plusieurs oses et disaccharides, avec peu de différences entre souches, et suggèrent des différences dans l'utilisation des osides complexes et hétérosides (qui seraient à confirmer par de vrais tests de consommation desdits substrats). En outre, les souches semblent se différencier par les vitesses et des intensités d'utilisation des substrats dans les conditions des deux tests.

1.4 Caractéristiques de la croissance et du métabolisme en fonction des substrats carbonés

Une étude plus approfondie a été menée afin de comparer les cinétiques de croissance, de consommation de substrat et de production de métabolites secondaires chez deux souches (L0469, CBS2499-like, diploïde et L0424, AWRI1499-like, triploïde), en présence des substrats carbonés suivants : D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-galactose, D-ribose, cellobiose, maltose, saccharose et tréhalose). Compte tenu de l'homogénéisation permanente et des prélèvements quotidiens réalisés, les cultures ont été réalisées en conditions aérobies.

1.4.1 En présence de monosaccharides

En conditions aérobies, les deux souches présentent des profils de croissance typiques (phase de latence, phase de croissance, phase de ralentissement et phase stationnaire). L'analyse des vitesses de croissance spécifiques instantanées (μ_{inst}) montre que celles-ci ne sont pas constantes pendant la phase de croissance. Ceci suggère une limitation de la croissance dans les conditions étudiées (par un paramètre non identifié). Pour la comparaison, nous considérerons que la valeur maximale μ_{inst} correspond au μ_{max} des souches étudiées, dans les conditions de l'expérience.

Pour les deux souches, la croissance sur D-glucose (Figure 44) et sur D-fructose (Annexe 11) est clairement associée à la consommation des substrats et ceux-ci sont totalement consommés sur le temps de l'expérience. Ces phénomènes s'accompagnent de la production d'éthanol, d'acide acétique et d'acétaldéhyde (Tableau 20, p134). Les quantités produites en acide acétique, largement inférieures à celles en éthanol, confirment les conditions d'aération modérée de nos cultures (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003). La production d'éthanol est concomitante à la consommation du substrat. La production de l'acide acétique et de l'acétaldéhyde a également lieu au cours de la consommation du glucose, mais est retardée par rapport à celle de l'éthanol. Pour les deux souches, l'éthanol et l'acide acétique peuvent être consommés après épuisement du substrat, comme rapporté par Wijsman *et al.* (1984).

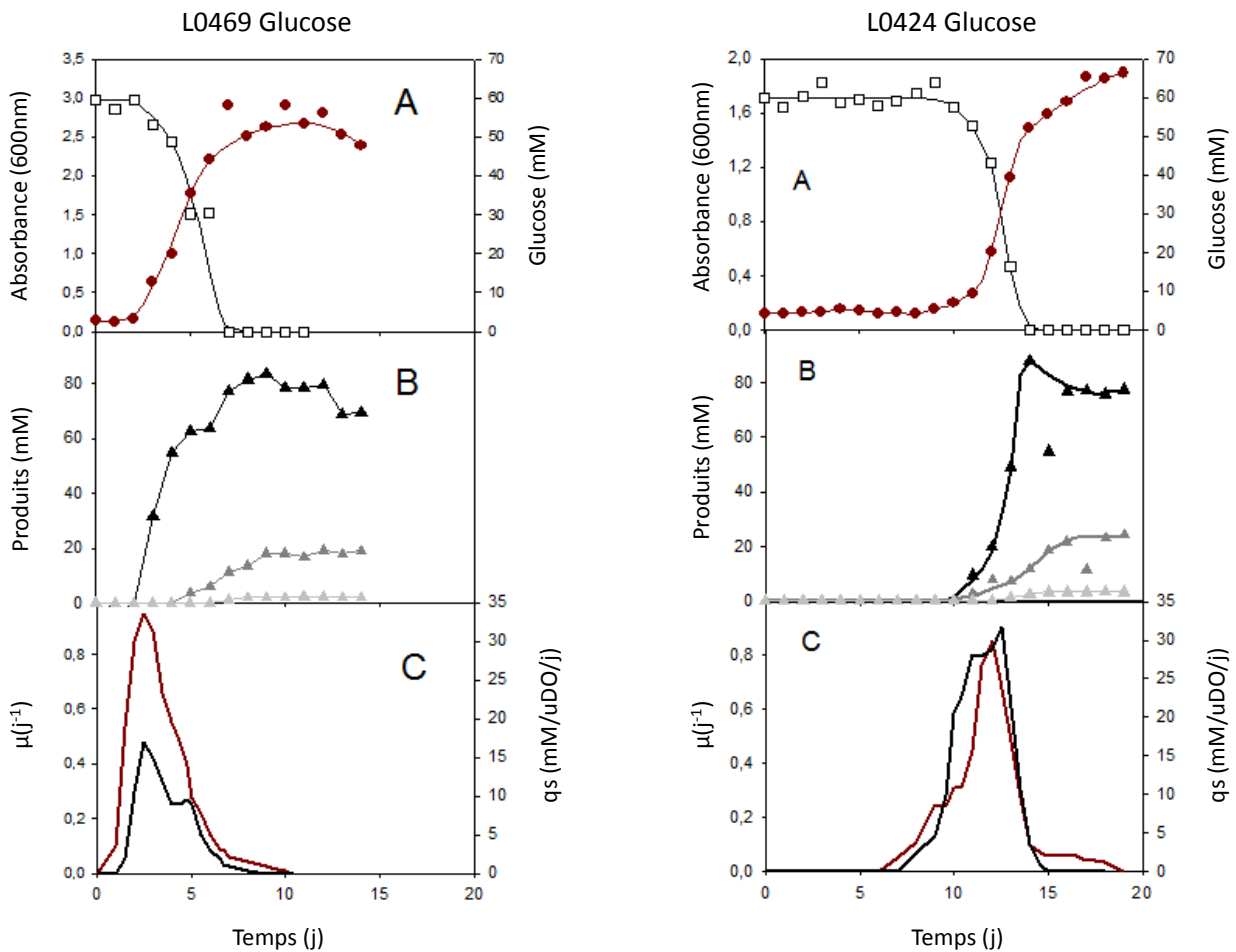


Figure 44 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé noir).

Des bilans de transformation du substrat en métabolites ont été établis en supposant que le métabolisme est strictement fermentaire. Le CO_2 n'a pas pu être mesuré, les quantités libérées étant trop faibles pour être déterminées avec précision par pesée (2,5 mg de CO_2 libéré par fermentation de 10g/L de glucose). Nous nous baserons donc seulement sur les dosages de l'éthanol, acide acétique ou acétaldéhyde formés. Si le métabolisme est strictement fermentaire, le ratio (éthanol + acide acétique + acétaldéhyde) / substrat consommé doit être égal à 2 ou presque si les quantités de substrats utilisées pour la construction cellulaire sont faibles. Néanmoins, une partie du substrat peut être totalement dégradée en CO_2 par métabolisme oxydatif (respiration) et, dans ce cas, le ratio sera inférieur à 2.

Ratios pour L0424 :

1 glucose → 1,41 éthanol + 0,25 acétate + 0,03 acétaldéhyde (ratio 1,69)

1 fructose → 1,42 éthanol + 0,36 acétate + 0,06 acétaldéhyde (ratio 1,84)

1 mannose → 0,37 éthanol + 0,04 acétate (ratio 0,41)

Ratio pour L0469 :

1 glucose → 1,40 éthanol + 0,23 acétate + 0,03 acétaldéhyde (ratio 1,66)

1 fructose → 1,42 éthanol + 0,27 acétate + 0,07 acétaldéhyde (ratio 1,76)

1 mannose → 1,59 éthanol + 0,04 acétate (ratio 1,63)

Compte tenu du déficit du bilan carbone observé chez les deux souches, il semble qu'elles présentent une légère activité respiratoire (production de CO₂ par oxydation dans le cycle de Krebs) dans les conditions de l'expérience, sur le D-glucose, le D-fructose et le D-mannose.

Tableau 20: Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur monosaccharides en conditions aérobies.

	Glucose		Fructose		Mannose		Galactose	
	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469
Latence (jours)	9	3	19	3	20	1	22	7
μ_{max} (j⁻¹)	0,82	1,0	0,35	1,3	0,41	0,56	0,39	0,39
ΔDO*	1,4	2,8	1,7	3,0	0,88	0,84	1,7	2,3
ΔSubstrat (mM)*	60	59	58	58	55	55	23	42
ΔEthanol (mM)*	89	78	81	82	21	90	0	0
ΔAcide acétique (mM)*	15	13	21	16	2	2	0	0**
ΔAcétaldéhyde (mM)*	2	2	4	3	0	0	0	0
Y_{x/s} (uDO/mM)	0,023	0,047	0,029	0,050	0,016	0,015	0,061	0,053

* Déterminé lorsque la totalité du substrat a été consommée ou lors de l'arrêt de la culture.

** L0469-Galactose : l'acide acétique a été produit puis consommé avant la fin de la culture

De manière générale, la souche L0424 présente des temps de latence plus longs et des vitesses de croissances et absorbances maximales plus faibles que la L0469, suggérant une moins bonne adaptation au milieu utilisé (Tableau 20).

Pour la souche L0424, dans les conditions de l'expérience, le glucose est le substrat qui permet la croissance la plus rapide. Ceci pourrait être lié au fait que les précultures ont été réalisées sur glucose. Néanmoins, chez la souche L0469, c'est en présence de fructose que la croissance est la plus rapide. De plus, chez cette même souche, les temps de latence sont sensiblement les mêmes sur glucose, fructose et mannose ce qui suggère l'absence de phénomène de répression catabolique. A l'inverse, chez la souche L0424, ces temps de latence sont environ 2 fois plus importants sur fructose et mannose. En présence de galactose, les deux souches présentent des phases de latence plus importantes que sur glucose.

En présence de glucose ou de fructose, la souche L0469 produit plus de biomasse (DOs deux fois supérieures à celles de L0424) et présente également des rendements de croissance plus élevés que la souche L0424. Ceci pourrait être lié au statut triploïde de cette dernière, qui rend la multiplication cellulaire plus couteuse.

La souche L0424 consomme bien la totalité du fructose, mais présente un temps de latence long comparativement au glucose et une vitesse de croissance deux fois moins élevée également. En « nanofermenteur » également, la consommation du fructose était apparue difficile chez cette souche, ce qui pourrait s'expliquer un déficit d'équipement métabolique spécifique de cette souche.

En présence de mannose, les deux souches présentent des vitesses spécifiques de croissance inférieures à celles obtenues sur glucose (Annexe 12). Malgré la consommation de la totalité du substrat, elles forment moins de biomasse et les rendements de croissance sont moins élevés que sur glucose ($Y_{x/s}$: 0,016 et 0,015 uDO/mM sur mannose contre 0,023 et 0,047 uDO/mM sur glucose).

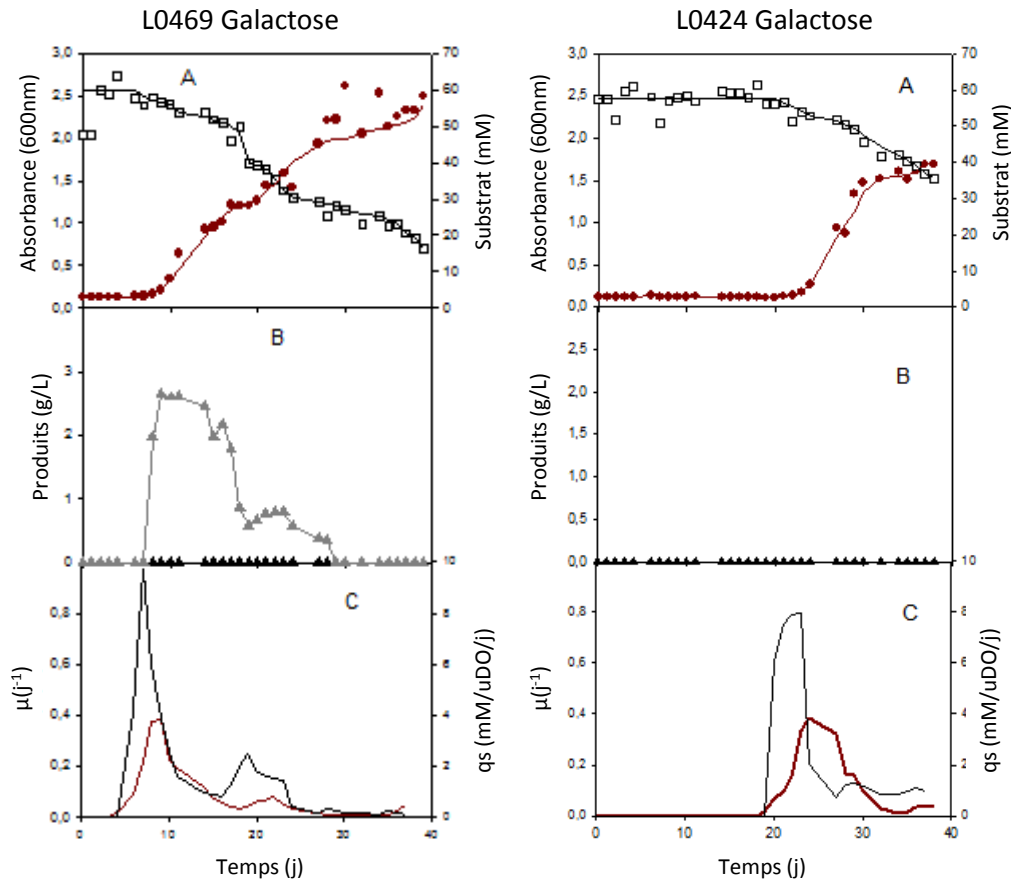


Figure 45 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-galactose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Galactose (\square) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de galactose, q_s (tracé noir).

En présence de galactose, les deux souches présentent des profils différents l'une de l'autre. Seuls 38 et 73% du substrat ont été consommés en 40 jours par L0424 et L0469 respectivement (Figure 45). La souche L0424 ne produit pas de métabolites secondaires, suggérant un métabolisme strictement respiratoire. La souche L0469 présente une croissance en deux « phases » : pendant la première, la consommation du galactose est associée à la production de l'acide acétique (2,63g/L soit 43mM produit), puis pendant la seconde, cette disparition du substrat est concomitante à celle de l'acide acétique produit (métabolisme oxydatif). Ces différences se traduisent notamment par un rendement en biomasse plus élevé pour L0424 (0,057 uDO/mM contre 0,040 uDO/mM chez L0469). Moktaduzzaman *et al.* (2015) observait également l'utilisation de la voie respiratoire, lors de la croissance de CBS2499 sur galactose en conditions aérobies en présence de sulfate d'ammonium. Ce phénotype n'était néanmoins pas associé à

l'absence des enzymes impliquées dans la voie fermentaire (pyruvate décarboxylase, alcool déshydrogénase et acétaldéhyde déshydrogénase). Il observait d'ailleurs que l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase, qui transforme l'acétaldéhyde en acide acétique, était supérieure, lors de la croissance sur galactose que sur celle sur glucose.

1.4.2 En présence de disaccharides

La consommation des disaccharides testés (tréhalose, saccharose, maltose et cellobiose) peut s'accompagner de la production d'éthanol et d'acide acétique, consommés lorsque le substrat est épuisé. C'est notamment le cas en présence de tréhalose (Figure 46).

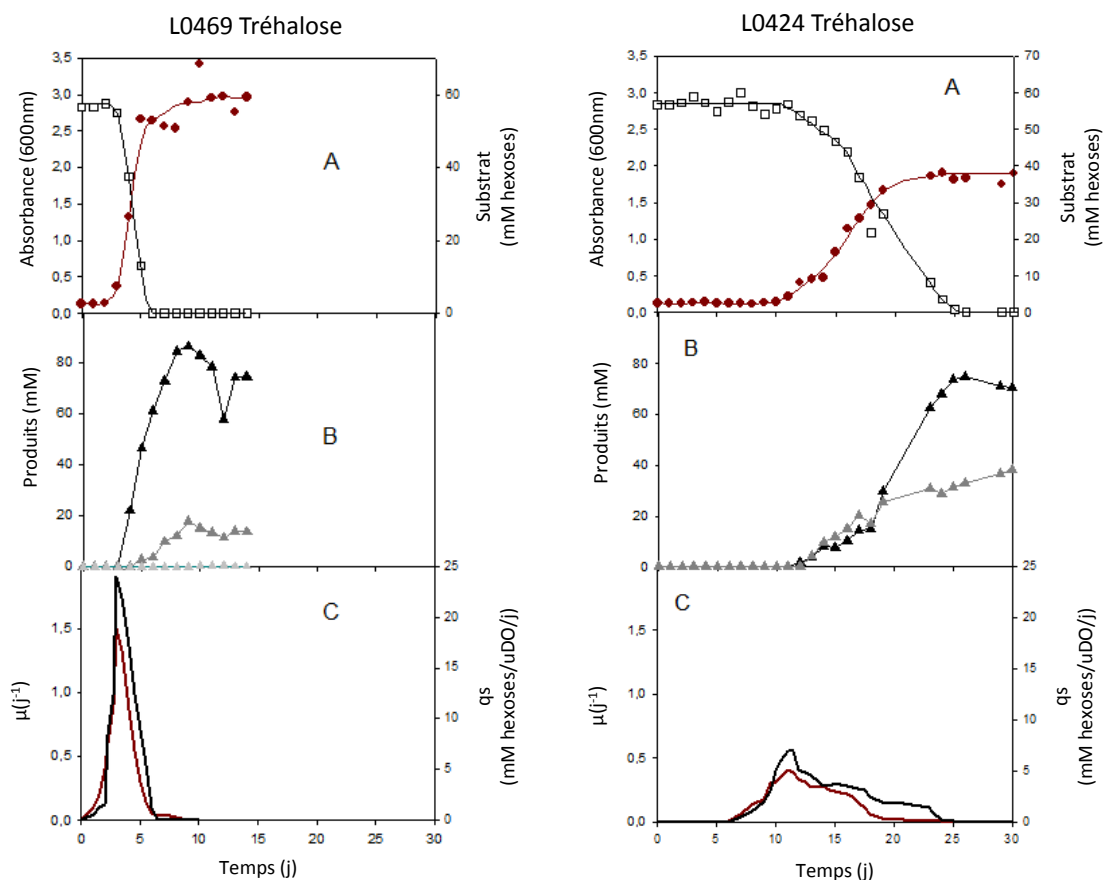


Figure 46: Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de tréhalose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Tréhalose (□) et absorbance (●); les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (▲), acide acétique (▲), acétaldéhyde (▲).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de tréhalose, q_s (tracé noir).

Néanmoins, le calcul des ratios de conversion des substrats en métabolites (éthanol et acétate) révèle que les comportements varient selon les souches et les disaccharides testés.

Pour L0424 :

1 tréhalose (2 hexoses) → 2,47 éthanol + 1,02 acétate (ratio 1,75 par hexose)

1 saccharose → 2,32 éthanol + 0,78 acétate (ratio 1,55 par hexose)

1 maltose → 0,91 éthanol + 1,74 acétate (ratio 1,32 par hexose)

Pour L0469 :

1 tréhalose → 2,88 éthanol + 0,08 acétate (ratio 1,48 par hexose)

1 saccharose → 3,30 éthanol + 0,62 acétate (ratio 1,96 par hexose)

1 maltose → 3,72 éthanol + 0,27 acétate (ratio 1,85 par hexose)

1 cellobiose → 2,44 éthanol + 0,24 acétate + 0,09 acétaldéhyde (ratio 1,39 par hexose)

Comme en présence des monosaccharides, la souche L0424 présente des temps de latence plus longs que L0469, quel que soit le disaccharide (Tableau 21, p140). Les vitesses de consommation spécifiques maximales sont également plus importantes pour la souche L0469 suggérant un transport et/ou un métabolisme plus efficace de cette souche et/ou une meilleure adaptation au milieu de base utilisé. D'autre part, les deux souches présentent également un métabolisme respiro-fermentaire.

Sur cellobiose, la souche L0424 présente deux phases de croissance, séparées par une phase de « latence » de 3 jours (Figure 47). Comme sur le galactose, elle utilise uniquement la voie respiratoire, ne consomme que 22% du disaccharide et présente en conséquence un rendement de croissance élevé (0,094 uDO/mM hexose). La souche L0469 présente à l'inverse, un métabolisme respiro-fermentaire.

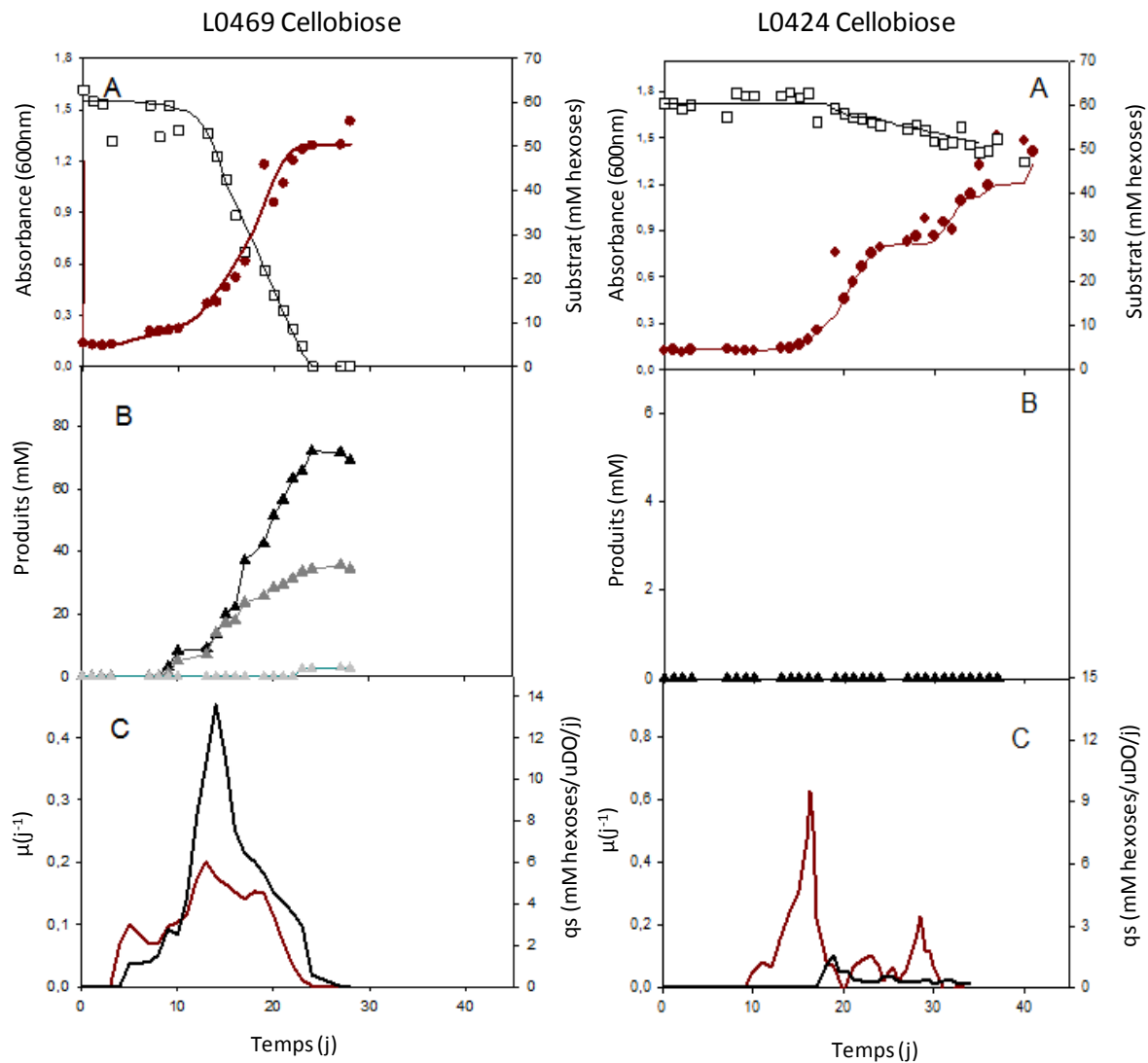


Figure 47 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de cellobiose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Cellobiose (\square) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de cellobiose, q_s (tracé noir).

De manière générale, les deux souches ont, quel que soit le disaccharide, des vitesses spécifiques de croissance inférieures à celles obtenues sur glucose (L0424 : 0,82 j⁻¹ et L0469 : 1,0 j⁻¹), l'exception de L0469 sur tréhalose. Le tréhalose est le disaccharide qui permet les croissances les plus rapides et le saccharose est celui qui est consommé le plus rapidement (Tableau 21).

Tableau 21 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur disaccharides en conditions aérobies.

	Tréhalose		Saccharose		Maltose		Cellobiose	
	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469
Latence (jours)	9	3	10	1	10	2	13	3
μ_{max} (j⁻¹)	0,49	1,5	0,52	0,67	0,19	0,41	0,62	0,21
ΔDO*	1,77	2,53	0,69	0,83	1,10	0,97	1,3	1,1
ΔSubstrat (mM hexose)*	60	56	45	54	53	51	14	59
ΔEthanol (mM)*	75	81	52	89	23	95	0	73
ΔAcide acétique (mM)*	31	4	18	17	46	7	0	34
ΔAcétaldéhyde (mM)*	0	0	0	0	0	0	0	3
Y_{x/s} (uDO/mM hexose)	0,029	0,045	0,015	0,015	0,020	0,019	0,094	0,017

* Déterminé lorsque la totalité du substrat a été consommée ou lors de l'arrêt de la culture.

1.4.3 Conclusions

L'étude de la croissance de deux souches de *B. bruxellensis* sur des cultures simples de mono et disaccharides montre les phénomènes suivants :

- Il existe des différences entre ces souches en termes d'adaptation au milieu et possiblement aux conditions d'aération. Globalement, la souche L0424 (triploïde) présente généralement des phases de latence plus importantes. Elle est souvent plus lente et moins efficace que la souche L0469 (diploïde).
- Comme observé par Rozpedowska *et al.* (2011) et Leite *et al.* (2013), la croissance sur monosaccharides fermentescibles, en conditions aérobies et non limitantes en substrat est de type respiro-fermentaire. En présence de galactose, les souches adoptent un métabolisme de type respiratoire (en accord avec Muktaduzzaman *et al.*, 2015). Sur certains sucres, les souches diffèrent sur le métabolisme emprunté à l'exemple du cellobiose (L0424 : métabolisme respiratoire, L0469 : métabolisme fermentaire).
- Les vitesses de croissance spécifiques maximales sont toujours supérieures sur glucose et les vitesses de consommations sont moins importantes sur disaccharides.

1.5 Ordre de préférence des substrats carbonés chez *Brettanomyces bruxellensis*

A la différence des milieux de laboratoire, les milieux fermentés contiennent des sucres en mélange. Nous avons vu que *B. bruxellensis* est capable d'utiliser un large panel de sucres. Nous avons donc réalisé des travaux préliminaires sur le comportement des deux même souches de *B. bruxellensis* en présence de mélanges de glucose et d'un autre sucre. Les précultures ont été réalisées sur tréhalose afin d'éviter de stimuler la préférence pour le glucose en enclenchant une répression catabolique.

Pour ces études, on considérera deux périodes : la première est associée à la consommation du glucose et se termine lorsque celui-ci est épuisé. Elle s'accompagne dans certains cas, de la consommation en partie ou en totalité du second substrat. La seconde période correspond à la consommation partielle ou totale du second substrat. Elle se termine lorsqu'il a été totalement consommé ou lors de l'arrêt de la culture.

1.5.1 Glucose + monosaccharides

Comme précédemment, la souche L0424 présente des temps de latence plus longs et des vitesses spécifiques maximales inférieures à celles de L0469, comme observé sur le mélange glucose+fructose ([Figure 48, page suivante](#)).

En présence de D-glucose et de D-fructose, la souche L0424 présente une phase de latence plus importante que sur les deux autres mélanges, confirmant la difficulté pour cette souche à utiliser le fructose. De manière générale, les deux substrats sont consommés simultanément et en conséquence, nous n'observons pas de préférence de ces souches pour le glucose ([Figure 48](#)). Néanmoins, le glucose est toujours consommé plus rapidement que le fructose (Q_s max glucose (L0424): 17 mM hexose/j/uDO vs 12 mM hexose/j/uDO pour le fructose) ([Figure 48](#)). Nous n'observons pas non plus de préférence pour le D-glucose en présence de D-mannose ([Annexe 14](#)). Les deux souches ont présenté des métabolismes respiro-fermentaires sur ces deux mélanges.

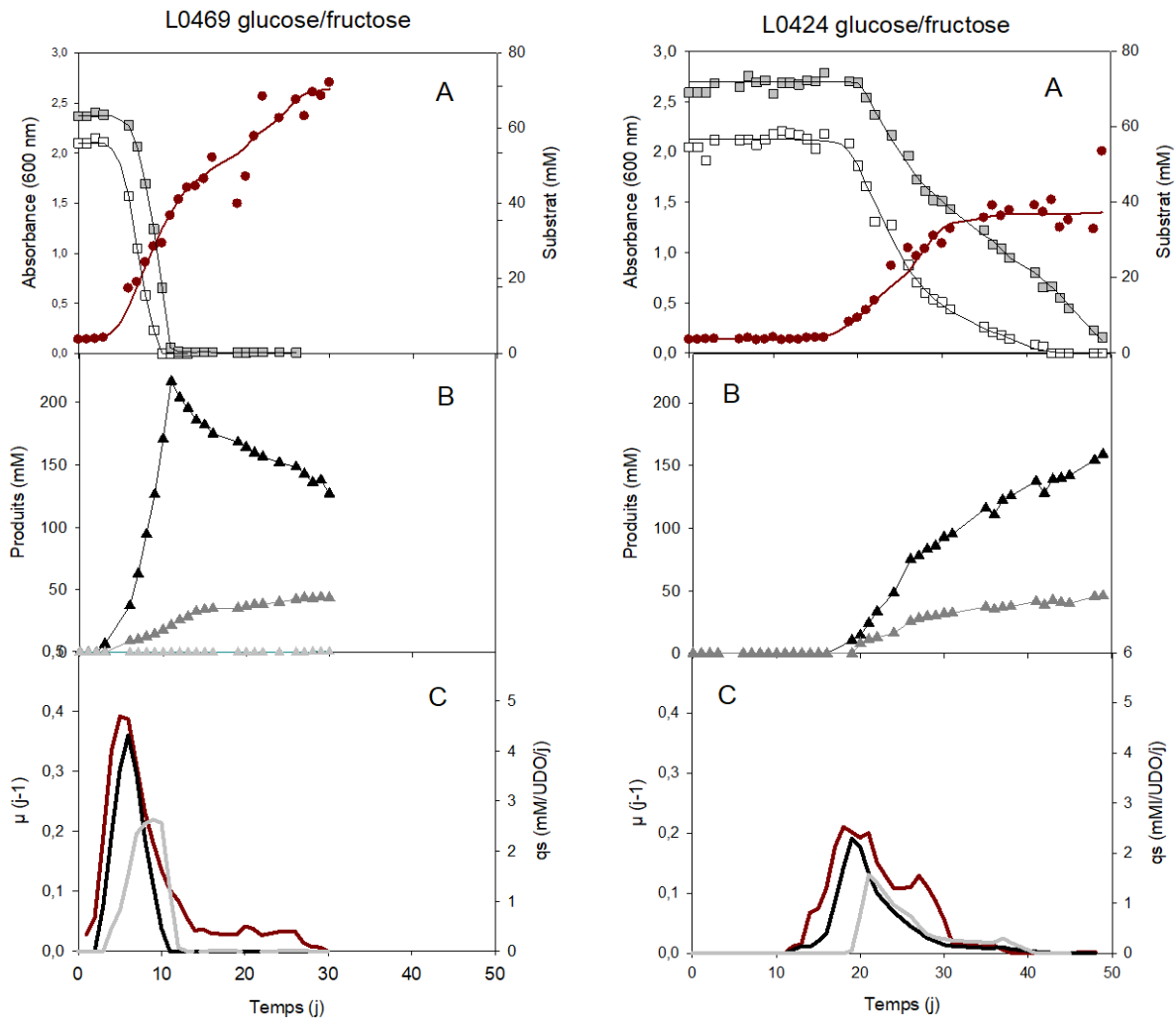


Figure 48 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires par les souches L0424 et L0469 en présence de glucose et de fructose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), fructose (\blacksquare) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé noir) et de fructose (tracé gris).

Ratio de conversion des substrats à l'épuisement du glucose

L0424 (pour mémoire ratio sur glucose seul 1,64) :

1 glucose + 1,26 fructose \rightarrow 2,54 éthanol + 0,78 acétate (ratio 1,76 par hexose)

1 glucose + 1,43 mannose \rightarrow 4,25 éthanol + 0,18 acétate + 0,11 acétaldéhyde (ratio 1,86 par hexose)

1 glucose + 0,31 galactose \rightarrow 1,70 éthanol + 0,36 acétate (ratio 1,57 par hexose)

L0469 (pour mémoire ratio sur glucose seul 1,66) :

1 glucose + 1,28 fructose \rightarrow 3,05 éthanol + 0,77 acétate (ratio 1,68 par hexose)

1 glucose + 1,45 mannose \rightarrow 4,33 éthanol + 0,18 acétate + 0,01 acétaldéhyde (ratio 1,84 par hexose)

1 glucose + 0,29 galactose \rightarrow 2,17 éthanol + 0,22 acétate (ratio 1,83 par hexose)

Tableau 22 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur mélange de glucose et de monosaccharides en conditions aérobies.

	Glucose/Fructose		Glucose/Mannose		Glucose/Galactose	
	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469
Latence (jours)	16	1	7	0	7	0
μ_{max} (j^{-1})	0,22	0,39	0,71	1,4	0,84	1,4
ΔDO^*	1,2	0,93	2,33	2,62	1,65	1,87
ΔGlucose (mM hexose)*	55	56	46	42	46	41
Qs max Glucose (mM hexose/j/uDO)	17	24	4	9	22	10
ΔSubstrat 2 (mM hexose)*	69	72	63	61	15	12
ΔEthanol (mM)*	139	171	198	182	78	89
ΔAcide acétique (mM)*	42	43	8	8	17	9
ΔAcétaldéhyde (mM)*	0	0	1	1	0	0
$Y_{x/s}$ (uDO/mM hexose)	0,010	0,007	0,021	0,025	0,027	0,035

* Déterminé lorsque le glucose a été consommé en totalité.

En présence de D-glucose et D-galactose, les deux souches consomment préférentiellement le glucose (Annexe 15). Simultanément à la consommation du glucose, une légère consommation du galactose est observée (Tableau 22). Les deux souches présentent une légère activité respiratoire (ratios de conversion inférieurs à 2). Comme sur les cultures simples, au final, le galactose n'a pas été consommé en totalité.

De manière générale, les deux souches ont produit moins de biomasse sur glucose+fructose comparativement aux autres mélanges. Sur glucose+galactose, les deux souches présentent les vitesses de croissance spécifiques les plus importantes, proches de celles sur glucose seul (L0424 : $0,82 j^{-1}$; L0469 : $1 j^{-1}$). En fin de fermentation, les biomasses produites sont également les plus importantes, signe d'un métabolisme plus efficace en présence de galactose.

1.5.2 Glucose + disaccharides

Sur les mélanges glucose + disaccharides, la souche L0424 présente toujours des temps de latence plus longs que la souche L0469 ; néanmoins, les taux de croissance et biomasses produites ne sont pas toujours inférieurs à ceux de L0469.

De manière générale, les deux souches présentent une préférence marquée pour le glucose et consomment prioritairement le glucose par rapport aux disaccharides. Cette préférence est plus marquée pour la souche L0424. Néanmoins, pour les deux souches, les comportements diffèrent en fonction des mélanges.

En présence de tréhalose, la souche L0424 ne consomme le disaccharide qu'après avoir épuisé le glucose (Figure 49, page suivante). Lors de la consommation du glucose, la souche L0424 a un métabolisme respiro-fermentaire. Elle ne consomme ensuite que 33% du tréhalose, ainsi qu'une partie de l'éthanol et produit de l'acide acétique.

Sur glucose et maltose, les deux souches commencent à consommer le maltose avant la disparition du glucose (Annexe 16). La souche L0469 présente une préférence moins importante et consomme ainsi 84% du maltose pendant cette 1^{ère} période. Elle a également une vitesse de croissance spécifique plus importante que la souche L0424 (Tableau 23, p146). Les deux souches ont un métabolisme respiro-fermentaire et à la fin de la consommation des deux substrats, les rendements de croissance sont similaires.

Sur glucose et cellobiose, les deux souches consomment prioritairement le D-glucose (Annexe 17) et présentent un métabolisme respiro-fermentaire lors de la consommation de celui-ci (ratios de conversion de 1,59 pour L0424 et 1,44 pour L0469). La souche L0424, comme cela était le cas sur culture simple, ne métabolise que 22% du cellobiose par voie oxydative (Tableau 23, p146). Elle consomme également l'éthanol produit lors de la fermentation du glucose. A la différence de L0424 et comme sur culture simple, L0469 présente un métabolisme respiro-fermentaire lors de la consommation du cellobiose.

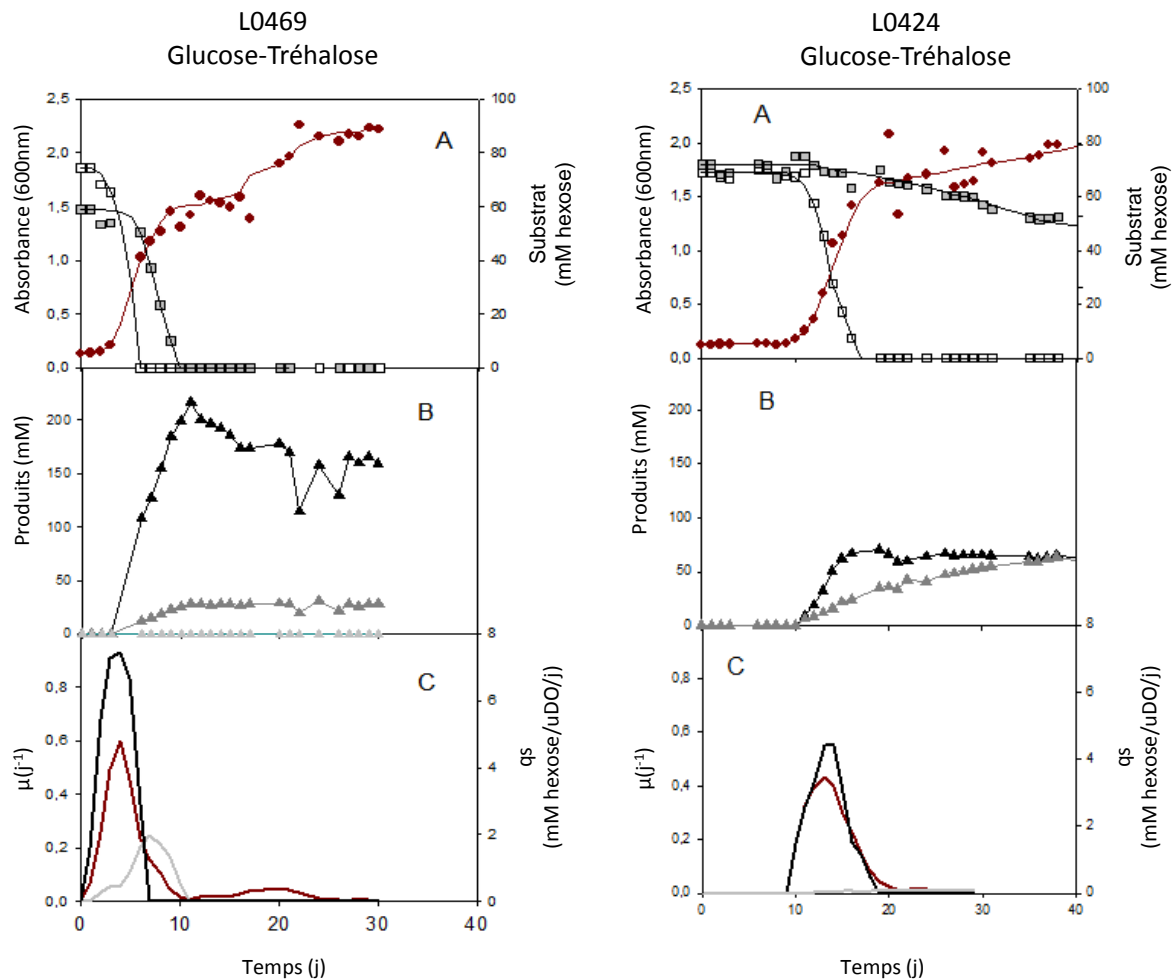


Figure 49 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de glucose et de tréhalose.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), tréhalose (\blacksquare) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé noir) et de tréhalose (tracé gris).

Ratios de conversion des substrats à l'épuisement du glucose

L0424 (pour mémoire ratio glucose seul 1,64):

1 glucose + 0 tréhalose \rightarrow 1,04 éthanol + 0,51 acétate (ratio 1,52 par hexose)

1 glucose + 0,21 maltose (eq. hexose) \rightarrow 1,63 éthanol + 0,57 acétate (ratio 1,73 par hexose)

1 glucose + 0 cellobiose \rightarrow 1,13 éthanol + 0,46 acétate (ratio 1,59 par hexose)

L0469 (pour mémoire ratio glucose seul 1,66) :

1 glucose + 0,11 tréhalose (eq. hexose) \rightarrow 1,51 éthanol + 0,16 acétate (ratio 1,49 par hexose)

1 glucose + 0,56 maltose (eq. hexose) \rightarrow 2,57 éthanol + 0,51 acétate (ratio 1,97 par hexose)

1 glucose + 0,06 cellobiose (eq. hexose) \rightarrow 1,36 éthanol + 0,17 acide acétique (ratio 1,44 par hexose).

Tableau 23 : Caractéristiques de croissance des souches L0424 et L0469 sur mélange de glucose et de disaccharides en conditions aérobies.

	Glucose/Tréhalose		Glucose/Maltose		Glucose/Cellobiose	
	L0424	L0469	L0424	L0469	L0424	L0469
Latence (jours)	9	1	4	0	10	0
μ_{max} (j^{-1})	0,56	0,53	0,70	1,58	0,70	0,55
ΔDO^*	1,36	0,89	1,88	2,42	1,36	1,02
ΔGlucose (mM hexose)*	69	74	68	66	67	69
Qs max Glucose (M hexose/j/uDO)	33	16	25	17	18	72
ΔSubstrat 2 (mM hexose)*	0	8	14	37	0	5
ΔEthanol (mM)*	72	112	111	170	76	94
ΔAcide acétique (mM)*	86	31	39	34	77	30
ΔAcétaldéhyde (mM)*	0	0	0	0	0	0
Yx/s (uDO/mM hexose)	0,020	0,011	0,023	0,023	0,020	0,014

* Déterminé lorsque le glucose a été consommé en totalité.

Remarque : les suivis de croissance et de consommation de substrat sur glucose, fructose, tréhalose, glucose+fructose et glucose + tréhalose ont été repris en conditions bien plus limitées en oxygène avec les souches L0424, CBS2499 et AWRI1608. La souche L0424 a donné exactement les mêmes ordres de préférence de substrat et les mêmes métabolismes respiro-fermentaires pour chaque substrat. Elle présentait cependant une croissance légèrement plus lente, une production d'acide acétique très réduite et n'a pas produit d'acétaldéhyde. La souche CBS2499 a présenté des profils de croissance et consommation de substrats ainsi que des préférences similaires à la souche L0469. La souche AWRI1608 a présenté un comportement intermédiaire (entre CBS2499 et L0424) en termes de cinétique et rendement de croissance ; en revanche, en présence de glucose-tréhalose, elle a montré une préférence pour le glucose nettement moins marquée.

1.5.3 Conclusion

Ces travaux montrent que :

- en mélange de monosaccharides fermentescibles (fructose ou mannose associé au glucose), les souches étudiées ne présentent pas de préférence et les hexoses sont métabolisés en parallèle. En revanche, le glucose est préféré au galactose, phénomène possiblement lié à la répression catabolique de ce dernier par le glucose (Moktaduzzaman *et al.*, 2015). Le galactose est par ailleurs un substrat qui seul, ne soutient qu'une croissance très lente dans les conditions étudiées, car tributaire de l'oxygène disponible.

- les deux souches présentent une préférence marquée pour le glucose en présence de disaccharides, qui pourrait s'expliquer par des phénomènes de répression catabolique bien que la croissance sur ces sucres seuls soit aussi rapide et efficace que sur glucose. Cette répression apparaît plus marquée chez la souche L0424.

2 Capacités d'altération de l'espèce *B. bruxellensis*

Si la problématique associée à *B. bruxellensis* se mesure à ses capacités de survie, elle est également fonction de ses capacités de production de phénols volatils (PVs). Plusieurs études mentionnent que les quantités produites et les vitesses de production sont souches-dépendantes (Conterno *et al.*, 2006 ; Martorell *et al.*, 2006 ; Barbin *et al.*, 2008 ; Agnolucci *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009). Cette variabilité pourrait être liée à la matrice d'isolement des souches (Crauwels *et al.*, 2017). Des différences de capacité d'altération pourraient donc exister au sein de l'espèce, au-delà des simples capacités de croissance et de survie.

Nous avons donc étudié les capacités de production de PVs d'un large panel de souches (33, [Annexe 2](#), [Annexe 18](#)), représentatif de la diversité des matrices d'origine et des groupes génétiques. Puis, en lien avec la partie précédente, l'influence de la source carbonée sur la production des PVs a été étudiée.

2.1 Capacités de production des phénols volatils en milieu modèle

Les 33 souches étudiées ont été isolées dans le cidre, la bière, la téquila, le bioéthanol et le vin. Au moins un représentant de chacun des 6 groupes génétiques a été inclus dans cette étude ([Annexe 18](#), [Figure 50](#)).

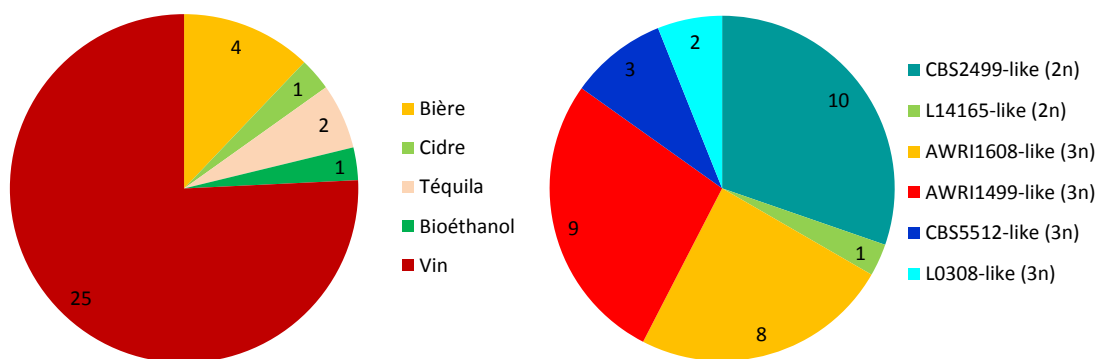


Figure 50 : Matrice d'origine (à gauche) et groupe génétique d'appartenance (à droite) des 33 souches étudiées pour leur capacité de production de phénols volatils.

Notre but était de déterminer les capacités « absolues » des souches à convertir les précurseurs hydroxycinnamiques en phénols volatils. Nous avons donc recherché des conditions dans lesquelles toutes les souches pourraient survivre le temps nécessaire pour réaliser une réaction mesurable. Les 33 souches ont été cultivées en milieu modèle défini, supplémenté en

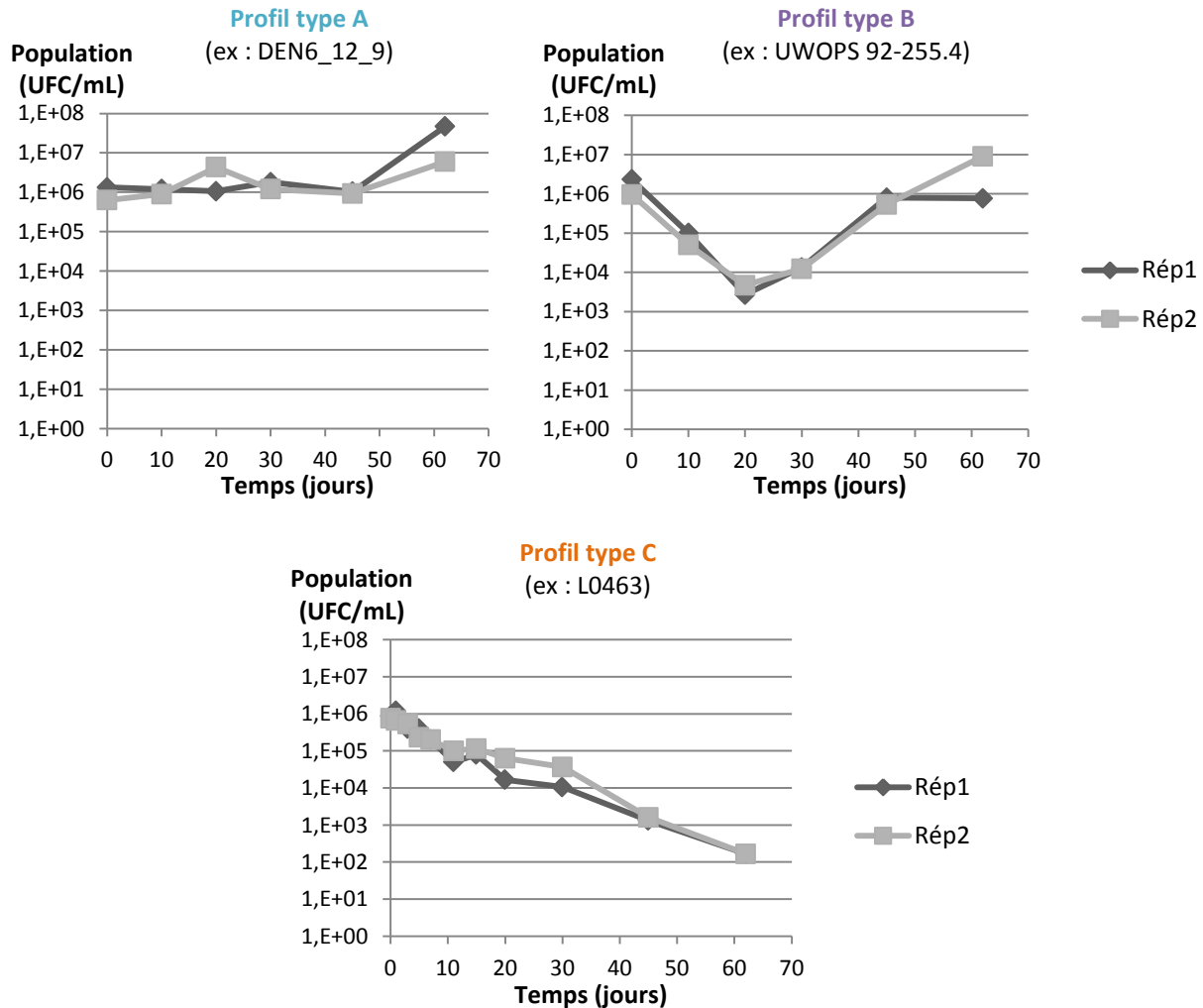


Figure 51 : Profils type de croissance de souches de *B. bruxellensis* en milieu défini pour la production de phénols volatils.

Les deux répliquats de chaque souche sont représentés (Rép1 et Rép2).

Type A : Maintien de la population cultivable à une population de 10^6 UFC/mL voire croissance de 1 à 2log. **Type B :** Perte de cultivabilité importante les deux à trois premières semaines (10^6 à 10^3 UFC/mL) puis reprise de la cultivabilité (UFC/mL) et de la croissance (DO). **Type C :** Absence de croissance et perte de cultivabilité importante (de 2 à 4log) dès les premiers jours de culture. Aucune reprise de la cultivabilité ou de la croissance n'a ensuite été observé.

précurseurs. Nous avons vérifié que les concentrations de précurseurs utilisées (20mg/L de chaque) n'inhibaient pas la croissance. Les cultures ont été réalisées sans agitation/aération, afin de se placer dans des conditions d'oxygénation proches de celles de la majorité des niches écologiques auxquelles elles sont associées et notamment celles de l'élevage en barrique des vins. Elles ont été, comme décrit dans la partie matériels et méthodes, suivies sur deux mois. De forts taux d'inoculation ($>10^5$ UFC/mL) ont été utilisés afin que les vitesses de production soient suffisantes pour que les PVs accumulés soient suffisamment abondants pour être dosés sans ambiguïté.

2.1.1 Profils de croissance

Dans les conditions du test, les profils d'évolution de la cultivabilité varient de manière importante entre les souches. Aucune des souches étudiées ne présente de croissance dès le début de la culture et certaines voient leurs populations cultivables diminuer les premières semaines. On distingue 3 types de profils différents, notés A, B et C (voir exemples [Figure 51](#)). Ainsi, après un temps de latence variable en fonction des souches (15 – 30 jours), une majorité d'entre elles présentent une croissance (type A et B). Les populations de certaines des souches de type C sont devenues indétectables sur boîte dès 20 à 30 jours (<1 UFC/mL). Cela révèle une mortalité de la population et/ou une entrée dans un état viable non cultivable des cellules. Cela concerne les souches L0516, 13EN11C11, L0424, L0417 et LB15109p. Toutes appartiennent au groupe triploïde AWRI1499-like. La souche L0424 présente un profil de type C dans ces conditions : aucune croissance n'a été observée et la cultivabilité a chuté de 10^6 à moins de 10^2 UFC/mL. En conditions aérobies, malgré des temps de latence longs, elle présentait, dans un milieu similaire (mélange glucose/fructose) une croissance (décrite au paragraphe précédent). Ainsi, la limitation en oxygène imposée dans cette expérience, perturbe la croissance de cette souche et celle d'une partie des souches triploïdes de manière plus importante.

L'analyse des sucres consommés (glucose et fructose) sur ces 60 jours indique qu'aucune des souches n'a totalement consommé les substrats ; ceux-ci n'étaient donc pas limitants dans les conditions de l'expérience. Les souches présentant des profils de type A ou B consomment 20 à 60 mM de sucres (sur les 69 mM présents). La souche 11AVB4 a, pour les deux réplicats, très peu consommé de sucres malgré un maintien de la population cultivable à 10^6 UFC/mL pendant toute la durée de l'expérience et la production de quantités importantes de phénols volatils ([Figure 52, page suivante](#)). Il en est de même pour la souche AWRI1499. Les souches de type C ont peu à pas consommé les substrats fournis. La souche L14168 fait exception, puisqu'elle a consommé 19 mM de sucres. Néanmoins, son profil est légèrement différent puisqu'elle a maintenu sa population à 10^6 UFC/mL pendant au moins 20 jours avant de voir sa population

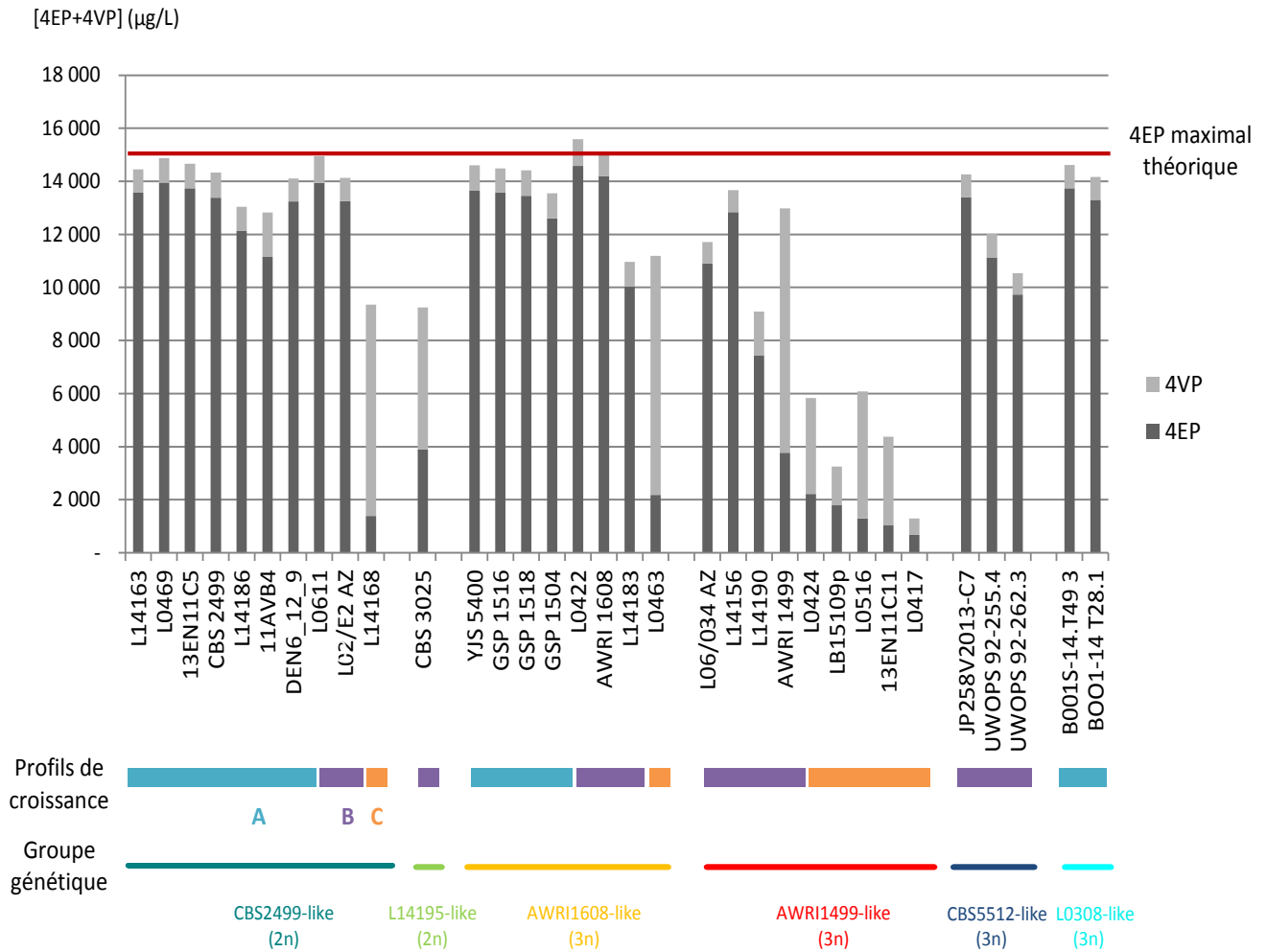


Figure 52 : Concentrations de 4-éthylphénol et de 4-vinylphénol produites par 33 souches de *Brettanomyces bruxellensis* après 60 jours de culture.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini supplémenté en acide *p*-coumarique (20mg/L) et en acide férulique (20mg/L), précurseurs des phénols volatils (25°C, sans apport d'oxygène).

décroître de 2 log.

2.1.2 Lien entre la production de phénols volatils et les profils de croissance

Les 33 souches phénotypées ont produit des phénols volatils. Toutes présentent donc des capacités d'altération. Les concentrations finales (après 2 mois) de 4-éthylphénol (4EP) et de 4-vinylphénol (4VP) sont représentées sur la [figure 52](#). Elles varient d'un facteur de 2 à 20 d'une souche à l'autre. Ainsi, à 60 jours, la production en 4-éthylphénol par L0417 était de 672 µg/L contre 13 577 µg/L pour la souche L14163 (valeurs moyennes des réplicats). Certaines souches ont produit une quantité de 4-éthylphénol proche de la valeur théorique maximale de 14,8 mg/L (pour 20 mg/L d'acide *p*-coumarique). Les quantités de 4-éthylguaïacol (4EG) produites sont, en revanche, toujours inférieures (d'un facteur 2 au minimum) à la valeur théorique maximale de 15,7mg/L (pour 20 mg/L d'acide férulique) : elles varient entre 112 µg/L (L0417) et 8 412 µg/L (L14156) ([Annexe 18](#)). De manière générale, dans le milieu considéré le ratio 4EP : 4EG varie entre 0,46 (L0463) à 6,32 (L0417) ([Annexe 18](#)). Pour 28 des 33 souches ce ratio 4EP : 4EG est supérieur à 1, la majorité présentant un ratio de 1,7. Cinq souches ont néanmoins produit plus de 4EG que de 4EP (L14168, L0463, AWRI1499, L0424 et L0516).

Les concentrations de 4EP produites sont inversement corrélées aux quantités de 4VP obtenues à J60 (Pearson, p -value < 10^{-6} , cor = -0,68). A l'inverse, il n'y a pas de corrélation entre les concentrations en 4EG et 4VP présentes à J60 (Pearson, p -value > 0,05). Pour chacune des souches, des quantités importantes en 4VG sont présentes à J60 (entre 487 µg/L pour L0417 et 14 558 µg/L pour L14168).

Les concentrations finales de 4EP et 4EG sont cohérentes avec les profils de croissance décrits précédemment (ANOVA, p -value < 10^{-10}) : les souches n'ayant pas présentées de croissance (profil type C) sont celles qui ont produit le moins ([Figure 52](#), [Annexes 18 et 19](#)).

Dans un milieu défini utilisé pour le test, les profils de croissance et les quantités produites ne semblent pas liés à la matrice d'origine ou au groupe génétique d'appartenance des souches ([Figure 52](#)). Dans toutes les matrices étudiées (bière, vin, téquila, bioéthanol...), on trouve des souches de *B. bruxellensis* capables de produire des quantités importantes de phénols volatils à partir des précurseurs hydroxycinnamiques. De même, dans tous les groupes génétiques et quel que soit le niveau de ploïdie, on trouve des souches capables de transformer la totalité de l'acide *p*-coumarique en 4EP ([Figure 52](#)).

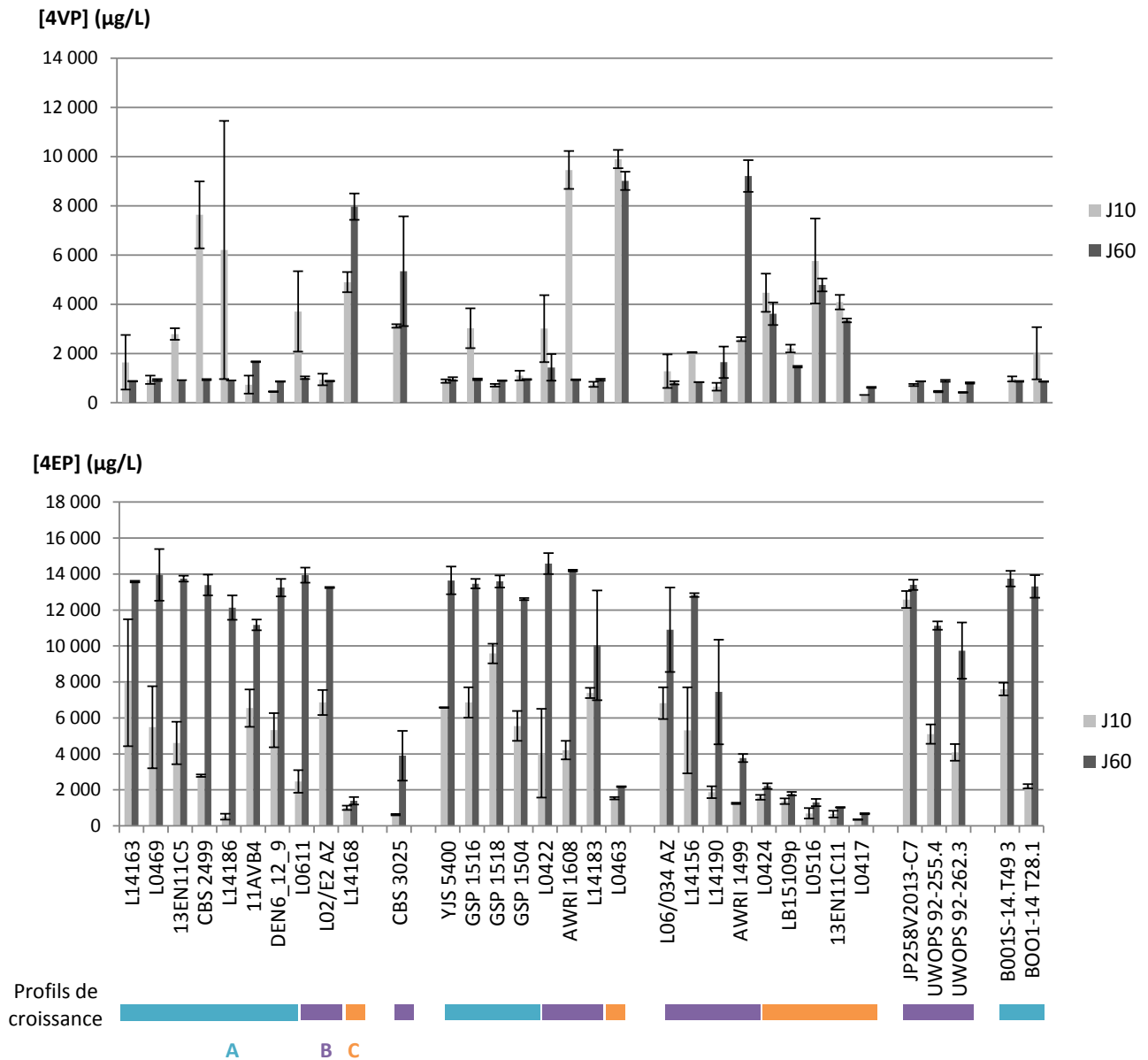


Figure 53: Concentrations de 4-vinylphénol (en haut) et de 4-éthylphénol (en bas) présentes à 10 jours et 60 jours de culture.

2.1.3 Analyse des cinétiques de production

Nous avons comparé les quantités de PVs (4EP et 4VP) à J60 à celles produites à 10 jours de culture (Figure 53). Toutes les souches étudiées, quel que soit leur profil de croissance, avaient déjà produit à la fois des 4VP et des 4EP à J10. Il en est de même pour le 4VG et 4EG. La production débute dès les 1ers jours de culture quel que soit le profil de croissance A, B ou C et donc l'état physiologique des cellules. Les VP s'accumulent puis sont convertis plus ou moins rapidement en EP, comme décrit dans de précédentes études (Dias *et al.*, 2003 ; Harris *et al.*, 2008 ; Coulon *et al.*, 2009). A l'exception de L0417, les souches de profil C ont produit en 10 jours des concentrations en 4VP de l'ordre du mg/L (2 000 à 6 000 µg/L) et des quantités d'4EP comprises entre 300 à 1500 µg/L. A l'exception de L14168, les concentrations en 4VP diminuent entre J10 et J60 et les quantités disparues sont proches de celles de 4EP produites (entre 327 et 622 µg/L de 4EP, Figure 53).

Toutes les souches de profil de croissance A ou B, à l'exception de la souche L14186, ont produit en 10 jours du 4VP qu'elles ont en grande partie déjà converti en d'4EP (concentrations à 10 jours de l'ordre du mg/L, entre 1 200 et 12 500 µg/L en 4EP). Entre J10 et J60, ces souches continuent de produire entre 2 650 à 11 620 µg/L d'EP (Figure 53).

Autrement dit, les concentrations de 4-éthylphénol produites à J10 représentent entre 4 et 93% de celles observées à J60, la proportion moyenne se situant à 40%. Dans le cas spécifique des souches de profil C, ces proportions varient de 51 à 76%. Ainsi, la plus faible production d'éthyls phénols observée chez les souches de profil de croissance C semble liée à leur incapacité partielle à transformer les vinyls phénols produits au début de la culture. La diminution de la concentration de cellules cultivables a donc un fort impact sur la vitesse globale d'accumulation des phénols volatils, mais ne semble pas l'empêcher totalement.

2.1.4 Capacités spécifiques de production des souches

Afin de rendre compte des capacités intrinsèques de production des souches (indépendamment de la population), nous avons calculé les quantités de PVs produits rapportées à la biomasse produite au cours du temps (méthode des trapèzes, décrite dans la partie Matériels et Méthodes).

Compte tenu du fait que, pour une partie des souches, nous n'avons plus pu mesuré de populations cultivables après 20 jours de culture, nous avons étudié les capacités des souches lors des 10 premiers jours (Figure 54). Les rapports 4EP et 4EG sur la biomasse produite à J10

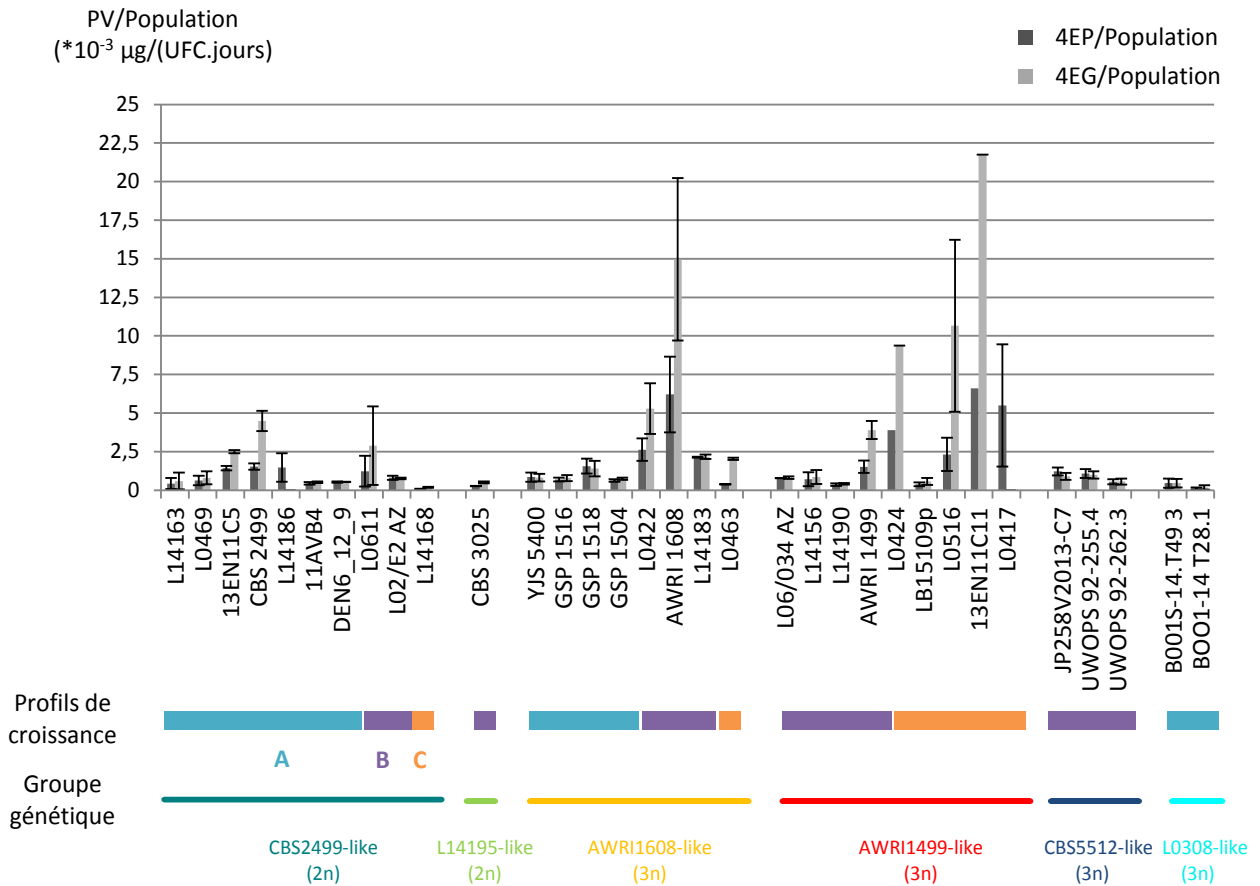


Figure 54 : Quantités de 4-éthylphénol et de 4-éthylguaiacol produites à J10, rapporté à l'intégrale de la population entre J0 et J10.

Les barres d'erreur représentent les écarts obtenus entre les deux répliqués.

sont variables entre les souches. Ils sont en général inférieurs à $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/(\text{UFC} \cdot \text{jours})$. Néanmoins, certaines souches présentent des capacités de production plus importantes. C'est notamment le cas de la souche de profil de croissance B, AWRI1608. Certaines des souches de profil C (population qui diminue) présentent également des capacités plus importantes que la moyenne (L0424, L0516, 11ENC11, L0417). Les capacités de production de 4EG paraissent néanmoins assez variables en fonction du réplica considéré pour certaines des souches (AWRI1608, L0516).

Entre 0 et 10 jours, la vitesse spécifique de production apparaît donc difficile à relier à l'état physiologique des cellules. Néanmoins, il apparaît clairement que des cellules dont la cultivabilité diminue peuvent avoir un potentiel d'altération non négligeable, et même supérieur, dans certains cas à celui de cellules dont l'état physiologique semble meilleur. Même s'il semble difficile de généraliser, ce phénomène est plus présent parmi les souches des groupes triploïdes AWRI1608-like et AWRI1499-like.

2.1.5 Analyse cinétique

Ce travail a été complété par l'analyse des profils de croissance et de consommation des sucres, parallèlement à la production de phénols volatils. Il a été réalisé sur les trois souches références : CBS2499, AWRI1608 et AWRI1499 et la [figure 55](#) présente les résultats obtenus.

Pour la souche CBS2499, la population se maintient puis elle diminue entre 3 et 7 jours de culture de $7 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^4$ UFC/mL et augmente ensuite jusqu'à 45 jours de culture à 10^7 UFC/mL avant de diminuer à nouveau pour atteindre 10^5 UFC/mL. Les souches AWRI1608 et AWRI1499 voient leurs populations cultivables diminuer de manière continue de 10^5 à 10^2 UFC/mL jusqu'à 20 jours. Elles augmentent ensuite jusqu'à 10^5 UFC/mL jusqu'à 45 jours.

Les souches CBS2499 et AWRI1608 partagent des profils de production similaires et produisent du 4VP, 4EP, 4EG et 4VG dès le 1^{er} jour de culture. La quantité de 4VP est maximale à 10 jours de culture. La quantité maximale mesurée (17 mg/L) est proche de la valeur théorique maximale en présence d'environ 20 mg/L de précurseur (14,63 mg/L, écart probablement dû aux variations lors de l'ajout des précurseurs). Les deux souches ayant des profils de croissance différents, la production n'est donc pas directement liée à la croissance, ou alors, pas de la même manière chez les deux souches. A 45 jours, la quasi-totalité des 4VP formés a été transformée en 4EP par les deux souches et on observe ensuite un ralentissement voire un arrêt de la production de 4EP.

Dans le cas de la souche AWRI1499, la production débute également dès le 1^{er} jour, mais plus lentement. Avant 45 jours, les 4VP sont convertis en 4EP au fur et à mesure de leur formation et s'accumulent donc moins que dans le cas des autres souches. En fin de culture, les résultats sont

plus difficiles à interpréter. Malgré un profil de croissance similaire à la souche AWRI1608, AWRI1499 présente, dans ce milieu, des capacités moins importantes de production de phénols volatils.

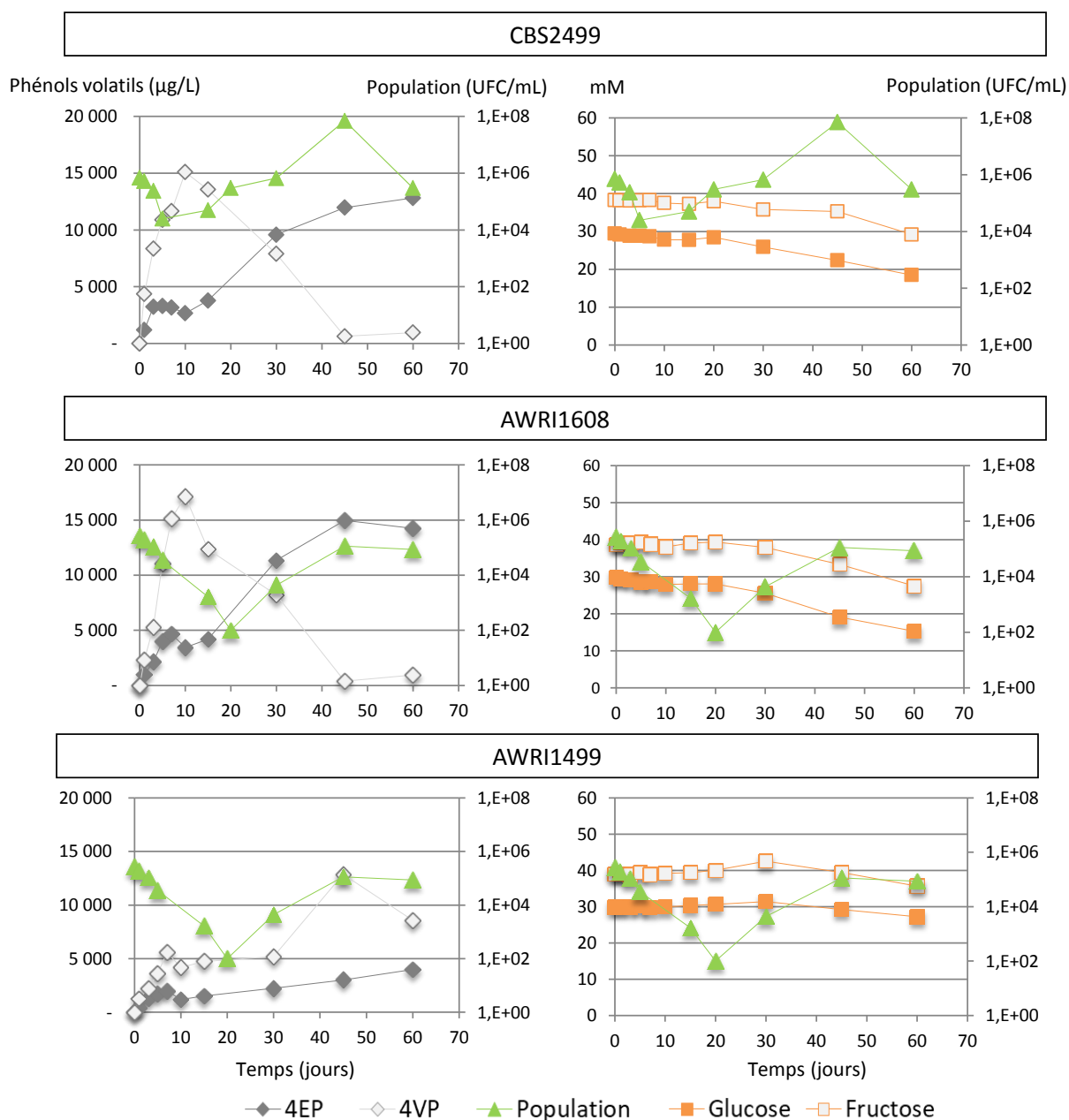


Figure 55: Cinétique de croissance, production en phénols volatils et consommation en sources carbonées par CBS2499, AWRI1608 et AWRI1499 en milieu modèle.

Néanmoins, le rapport entre la quantité de 4EP produite et la biomasse produite sur les 60 jours de culture montre que la souche AWRI1608 présente les meilleures capacités de production ($1,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{UFC}$) suivie d'AWRI1499 ($1,15 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{UFC}$) puis de CBS2499 ($0,011 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}/\text{UFC}$).

La consommation du glucose et du fructose commence entre 20 et 30 jours pour les trois souches. Le glucose et le fructose semblent être consommés en même temps et aucune des souches n'a consommé la totalité des sucres présents. Pour aucune des souches, la production de PVs ne semble associée à la consommation des sucres présents.

2.2 Nature du substrat carbonée supportant la croissance de *B. bruxellensis* et production de phénols volatils en milieu défini.

Nous avons étudié les capacités de production de *B. bruxellensis* en présence de D-glucose, de D-fructose et de tréhalose car ce sont les trois sucres fermentescibles résiduels majoritaires des vins (voir chapitre suivant). Le comportement des souches CBS2499 (diploïde), L0424 (triploïde, AWRI1499-like) et AWRI1608 (triploïde) a été étudié sur ces sucres seuls ou en mélange. De plus, les levures sont cultivées en condition de micro-aérobie (agitation seulement au moment des prélèvements donc apport irrégulier en O₂). A l'exception de AWRI1608 en présence de tréhalose (problème technique ayant imposé la fin prématurée de la culture), les cultures ont été suivies jusqu'à épuisement du substrat. Toutes les souches ont consommé ces trois substrats et leur consommation est associée à la production d'éthanol et d'acide acétique. Comme au paragraphe 1.4. de ce chapitre, l'analyse des rendements en (éthanol+ acide acétique) a été utilisée pour déterminer les métabolismes mis en place par les souches sur ces substrats dans les conditions de l'expérience. Pour rappel, un rendement de 2 moles d'éthanol par mole d'hexose suggère un métabolisme strictement fermentaire. Un rendement inférieur à 2 indique plutôt un métabolisme respiro-fermentaire. Les prélèvements en phénols volatils ont été réalisés, en général, en début, milieu et fin de phase croissance.

Les souches CBS2499 et AWRI1608 présentent des variations en DO (1,5 uDO), des rendements en biomasse (environ 0,025 uDO/mM) et des phases de latence comparables ([Tableau 24](#) et [Tableau 26](#)) sur chacun des 3 sucres. Comme observé précédemment, la souche L0424 est moins adaptée au milieu utilisé, et ses vitesses et rendements de croissance sont généralement 2 à 3 fois inférieurs à ceux déterminés pour les deux autres souches ([Tableau 25](#)). Le rendement de la souche AWRI1608 sur tréhalose est anormalement élevé (0,048 uDO/mM) et l'expérience mériterait d'être refaite (problème technique).

De façon générale, les quantités d'acide acétique produites sont faibles comparativement à ce qui était observé en conditions d'agitation constante (paragraphe 1.4.), ce qui est généralement rapporté en conditions limitantes en oxygène (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003 ; Capusoni *et al.*, 2016). Dans les conditions d'aération limitée, il n'y a pas eu de formation d'acétaldéhyde, quels que soient la souche et le substrat étudié.

Pour la souche CBS2499, les rendements en éthanol + acétate obtenus en présence de tréhalose et de glucose/tréhalose sont au moins égaux à deux suggérant un métabolisme strictement fermentaire. Ces rendements sont inférieurs à 2 sur les autres substrats, suggérant un métabolisme respiro-fermentaire, malgré la limitation en oxygène. Les deux autres souches présentent également des métabolismes de type respiro-fermentaire sur l'ensemble des sucres et mélanges de sucres testés. La stimulation de la respiration est particulièrement marquée avec la souche L0424 sur tréhalose seul.

Tableau 24 : Bilan des cultures de *B. bruxellensis* CBS2499 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats).

Milieu	Glucose	Fructose	Tréhalose	Glucose/ fructose	Glucose/ tréhalose
Δ DO	1,6	1,4	1,3	1,5	1,4
Δ S (mM hexose)	58	58,2	46	56,6	44,3
Δ acétate (mM)	14	15	14	16	21
Δ Ethanol (mM)	92	99	88	88	71
$Y_{X/S}$ (uDO/mM)	0,027	0,024	0,026	0,027	0,031
Ratio $\frac{\text{Ethanol} + \text{acetate}}{\text{substrat}}$ mole/mole hexose	1,83	1,96	2,22*	1,82	2,09
Temps nécessaire pour disparition du substrat (jours)	26	26	24	Glucose : 18 Fructose : 26	Glucose : 12 Tréhalose : 22
Production de 4EP finale (μ g/L)	5810	6397	6076	6103	5980
Rendement de conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique	79%	86%	82%	82%	81%

*valeur aberrante, erreur possible sur le dosage du tréhalose ou consommation d'autres éléments du milieu parallèlement au tréhalose

Tableau 25 : Bilan des cultures de *B. bruxellensis* L0424 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats).

Milieu	Glucose	Fructose	Tréhalose	Glucose/ fructose	Glucose/ tréhalose
Δ DO	0,66	0,75	0,56	0,60	0,54
Δ S (mM hexose)	61	60	45	65	62
Δ acétate (mM)	6	8	7	7	6
Δ Ethanol (mM)	88	91	14	92	92
$Y_{X/S}$ (uDO/mM)	0,010	0,012	0,012	0,009	0,0087
ratio $\frac{\text{Ethanol} + \text{acetate}}{\text{substrat}}$ mole/mole hexose	1,54	1,65	0,47	1,52	1,58
Temps nécessaire pour disparition du substrat (jours)	27	29	23	Glucose : 23 Fructose : 29	Glucose : 19 Tréhalose : 30
Production de 4EP finale (μ g/L)	6547	7275	6912	7550	7024
Rendement de conversion de l'acide <i>p</i> - coumarique	88%	98%	93%	102%	95%

Tableau 26 : Bilan des cultures de *B. bruxellensis* AWRI1608 effectué à l'épuisement du substrat (ou à l'épuisement du glucose pour les cultures sur mélange de substrats).

Milieu	Glucose	Fructose	Tréhalose*	Glucose/ fructose	Glucose/ tréhalose
ΔDO	1,6	1,5	0,48	1,8	1,4
ΔS (mM hexose)	58	60	9,7	62	57
Δacétate (mM)	11	8	4	10	8
ΔEthanol (mM)	69	91	14	84	87
Y _{X/S} (uDO/mM)	0,028	0,025	0,049	0,028	0,024
Ratio ^{Ethanol+ acetate} /substrat mole/mole hexose	1,38	1,65	1,80	1,52	1,67
Temps nécessaire pour disparition du substrat	32 jours	36 jours	ND Arrêt après 30 jours	Glucose : 33 Fructose : 36	Glucose : 33 Tréhalose : 38
Production d'EP finale (μg/L)	7 068	7 006	4 060	6 570	6 705
Rendement de conversion de l'acide <i>p</i> -coumarique	96%	95%	55%	89%	91%

*la culture n'a pas pu être suivie jusqu'à épuisement du tréhalose (Problème technique).

En présence de glucose/tréhalose, il est à noter que les souches CBS2499 et L0424 présentent une préférence marquée pour le glucose, la consommation du tréhalose ne commençant que lorsque le glucose est épuisé, comme c'était le cas lors des cultures plus aérées (paragraphe 1.5.2). Dans le cas de la souche AWRI1608, la consommation du tréhalose commence après celle de glucose, mais il est ensuite consommé plus rapidement que le glucose puisqu'ils sont épuisés en même temps (Figure 56).

Dans toutes les conditions étudiées, les trois souches ont produit des phénols volatils et dans tous les cas où la culture a été suivie jusqu'à épuisement du substrat, les rendements de conversion de l'acide *p*-coumarique sont supérieurs à 80%. Ces rendements de conversion sont particulièrement élevés dans le cas des souches L0424 et AWRI1608. Ceci est cohérent avec le fait que pour ces deux souches, la production est plus précoce et plus rapide que pour la souche CBS2499 (Figure 56). La production de 4EP en présence de tréhalose par AWRI1608 fait exception, puisque seuls 4mg/L (contre 7mg/L pour les autres) ont été produits. Néanmoins, ce résultat pourrait être lié à l'arrêt prématuré de cette culture (problème technique).

La production semble également légèrement plus lente en présence de fructose pour la souche CBS2499. Néanmoins, pour chaque souche étudiée, le sucre a globalement peu d'influence sur les quantités de PV déterminées aux trois stades de prélèvement (Annexes 20, 21 et 22).

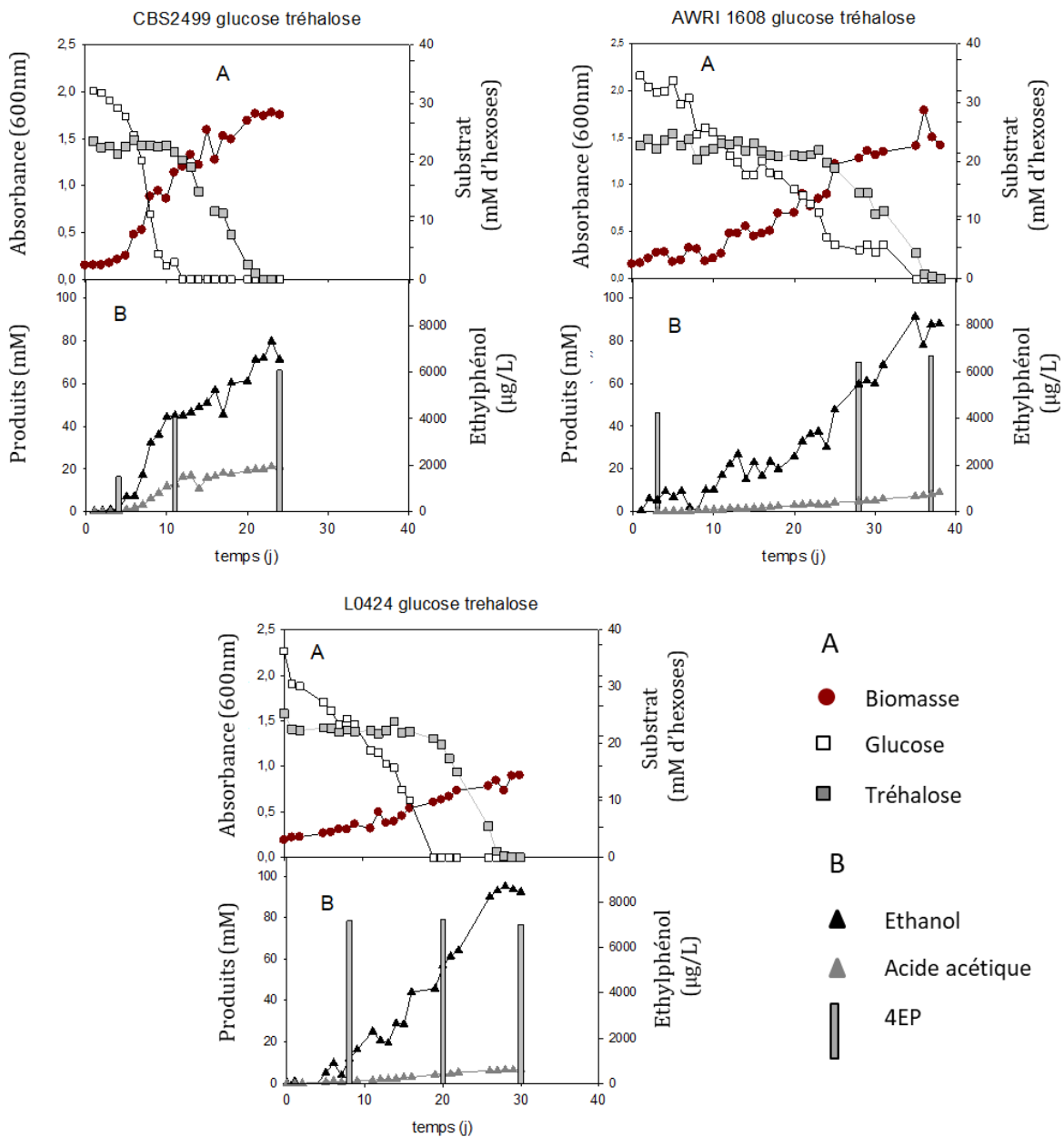


Figure 56 : Profils de croissance et de production d'éthyl phénols des souches CBS2499, L0424 et AWRI1608 en présence de glucose et de tréhalose, en milieu synthétique défini.

En A, sont représentés les profils de croissance et de consommation en sucres. En B, sont présentés les métabolites produits (éthanol, acide acétique et phénols volatils).

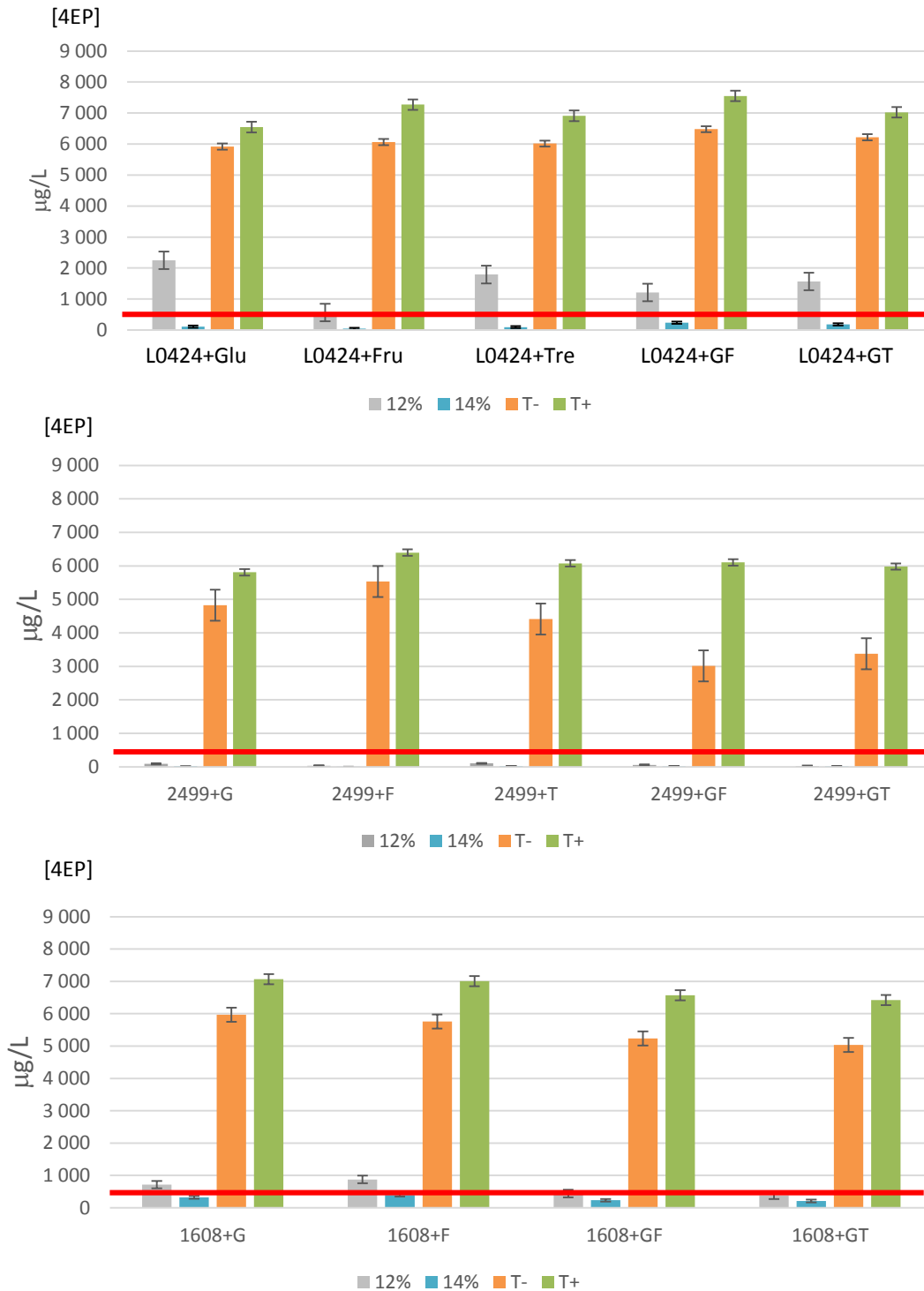


Figure 57 : Effets de l'aération et de la présence d'alcool sur la production de 4-éthylphénol chez CBS2499, L0424 (triploïde, AWRI1499-like) et AWRI1608.

Le **T-** représente les cultures sans aération, le **T+** représente les cultures ayant régulièrement été aérées lors des prélèvements. Les barres d'erreur représentent les écarts à la moyenne des deux réplicats de chaque culture. La ligne rouge représente le seuil de perception du 4EP de 440µg/L dans une solution modèle (Chatonnet et al., 1992). **G** : Glucose, **F** : Fructose, **T** : Tréhalose.

2.3 Influence de l'éthanol et d'une privation d'oxygène sur *B. bruxellensis* en milieu synthétique de base

Parallèlement aux cultures en flacons décrites dans le paragraphe précédent, des cultures ont été réalisées en distribuant une partie du milieu inoculé du flacon dans des tubes non agités, non prélevés régulièrement, afin de limiter au maximum les apports en oxygène et en absence ou en présence de 12% ou 14% d'éthanol, concentration communément retrouvées dans le vin (3 modalités). Ces études avaient pour objectif de déterminer l'influence de l'oxygène et de l'éthanol sur la croissance et la production en phénols volatils, en fonction de la source carbonée. Les cultures en tubes ont été prélevées une première fois au moment de la phase de croissance dans les cellules aérées (mesure de l'absorbance et des sucres). Puis, lors de l'arrêt de la culture, l'absorbance ainsi que les concentrations en sucres et en phénols volatils ont été déterminées.

Comme vu dans le paragraphe précédent, dans des cultures agitées et aérées régulièrement (par le biais des prélèvements), au moment de l'épuisement du substrat, les concentrations en 4-éthylphénol produites sont proches de la concentration maximale théorique, quels que soient la souche et le substrat carboné. Dans les cultures sans aération (notées T-, [Figure 57](#)), en fin de suivi (31 à 39 jours), la concentration finale en 4EP mesurée est inférieure d'environ 15% aux concentrations obtenues dans les cultures aérées (T+, [Figure 57](#)). La production de 4-éthylphénol est encore drastiquement diminuée lorsque les souches de *B. bruxellensis* sont cultivées sans agitation et en présence de 12% ou 14% d'éthanol. A 12% d'éthanol, seule la souche triploïde L0424 produit des concentrations supérieures au seuil de perception (Chatonnet *et al.*, 1992). Avec 14% d'éthanol, et sur les temps d'expérimentation retenus (entre 31 et 39 jours) aucune des souches étudiées ne produit suffisamment de 4-éthylphénols pour atteindre ce seuil. Dans tous les cas étudiés, les deux souches triploïdes AWRI1608 et L0424 produisent des quantités de 4EP supérieures à celles obtenues avec la souche diploïde CBS2499 ([Figure 57](#)) et celle-ci voit sa production particulièrement inhibée en présence d'éthanol. Quels que soient la souche et le substrat, c'est toute la voie de transformation des acides hydroxycinnamiques qui est ralentie, car les concentrations de vinyl phénols sont elles aussi très basses en présence d'éthanol.

Concernant la croissance des souches et la consommation des substrats, les résultats sont très similaires sur les 3 souches, seuls ceux obtenus avec la souche L0424, la plus forte productrice, seront discutés. Un exemple de suivi de croissance effectué sur fructose est présenté sur la [figure 58](#).

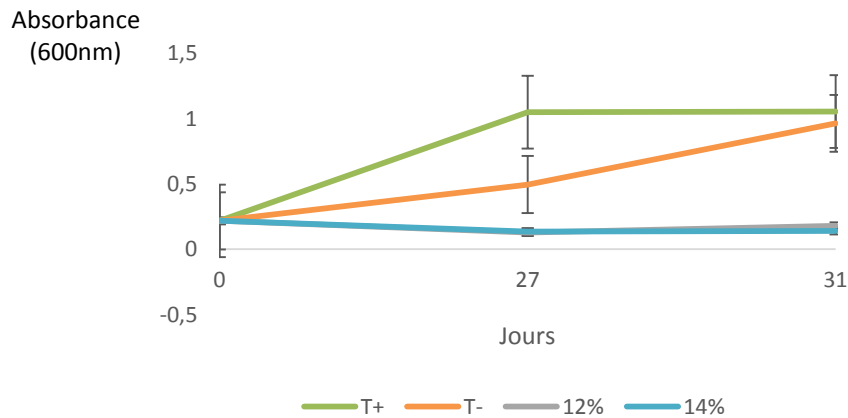


Figure 58 : Effet de l'aération et de l'éthanol sur la croissance de la souche *B. bruxellensis* L0424 en présence de fructose.

Le T- représente les cultures sans aération, le T+ représente les cultures ayant régulièrement été aérées lors des prélèvements. Les barres d'erreur représentent les écarts à la moyenne des deux réplicats de chaque culture.

La croissance de la souche est ralentie dans des conditions non aérées comparativement à des conditions d'aération régulières. Ainsi, à t= 27 jours, dans la culture n'ayant pas été préalablement prélevée, la souche L0424 présente une absorbance deux fois moins importante que dans la culture en conditions microaérobies. On note également que la croissance est fortement stimulée par le prélèvement à t= 27 jours pour la modalité non aérée. En présence d'éthanol (12% ou 14%), aucune croissance n'est observée avec la méthode retenue (mesure d'absorbance, [Figure 58](#)).

La consommation de substrats est directement associée à la croissance et donc modulée par la présence d'éthanol, quel que soit le substrat considéré : les quantités consommées sont 2 à 3 fois inférieures à celles consommées dans les cultures témoins sans éthanol (aérées ou peu aérées). La limitation des apports d'oxygène diminue nettement les vitesses spécifiques de synthèse de 4EP de la souche L0424, quel que soit le substrat ([Figure 59](#)). Si l'on maintient l'aération à un niveau bas, les capacités de biosynthèses ne sont en revanche que peu altérées par ajout de 12% d'éthanol (comparaison T- et T12%, [Figure 59](#)). Mais si l'on augmente encore la teneur en éthanol (14%), les capacités de bioconversion sont très nettement altérées. Un profil très similaire est obtenu si l'on considère la concentration totale EP + VP produite (non montré). C'est donc bien toute la voie de bioconversion qui est altérée.

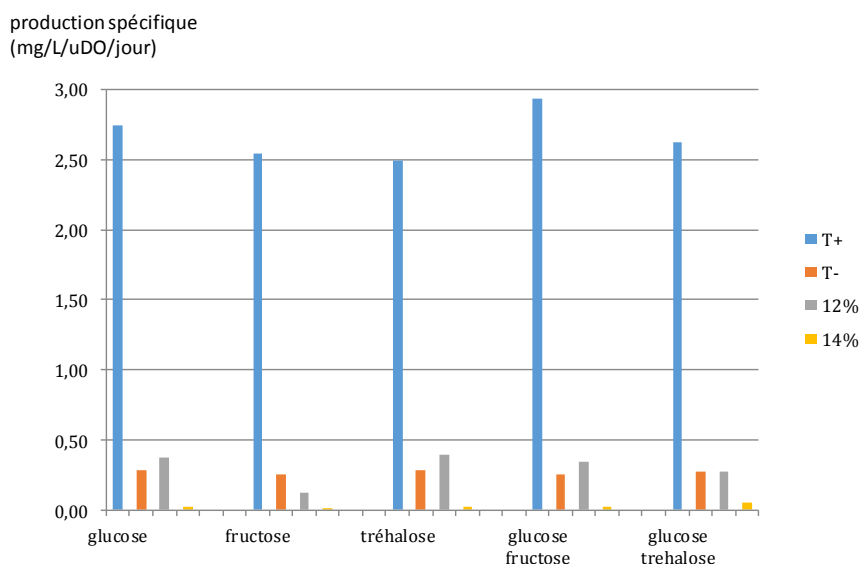


Figure 59 : Effet de l'aération et de l'éthanol sur les rendements de production en 4EP de la souche *B. bruxellensis* L0424.

Le T- représente les cultures sans aération, le T+ représente les cultures ayant régulièrement été aérées lors des prélèvements. Ces valeurs représentent la concentration en 4EP rapportée à la DO. Ces données correspondent aux mesures effectuées lors des prélèvements réalisés à 27 jours dans chacune des cultures. Pour le T-, T12% et T14%, cela correspond au premier prélèvement.

3 Discussion et conclusion

L'espèce *B. bruxellensis* présente une diversité génétique importante et sa population apparaît notamment structurée en fonction du niveau de ploïdie et des nombreuses matrices dans lesquelles elle a été isolée. Dans ces produits fermentés, des mono, di et trisaccharides sont présents et directement accessibles pour sa croissance. Dans des conditions limitantes en oxygène, qui correspondent aux conditions d'élaboration de ces produits, les capacités de croissance de 46 souches provenant de différents niveaux de ploïdie et matrices ont été étudiées sur 16 substrats carbonés.

Quel que soit le groupe génétique considéré, la majorité des souches est capable d'utiliser plusieurs sources carbonées parmi lesquels des hexoses (glucose, fructose, mannose, galactose) et certains disaccharides (cellobiose, maltose, tréhalose et saccharose), en accord avec les travaux de Conterno *et al.* (2006) et de Galafassi *et al.* (2011). Les pentoses (à l'exception du ribose) sont très peu utilisés par *B. bruxellensis*. Les capacités biodégradatives pourraient également concerner des glucides plus complexes comme le suggèrent certains résultats sur plaque Biolog. Des analyses préliminaires de biodégradation de polysaccharides semblent confirmer cela, mais les vitesses de dégradation sont faibles (Rapport de stage Baptiste Clavé). Mais le résultat majeur de cette étude est que les profils de consommation des sucres les plus abondants dans les vins (voir chapitre suivant) varient peu entre les souches, quels que soient leur matrice d'origine et leur

groupe génétique d'appartenance. La diversité phénotypique est en effet bien moins importante que celle que l'on peut retrouver chez la bactérie *O. oeni* qui partage en partie la même niche écologique (cidre, vin, Cibrario *et al.*, 2016). En conséquence, l'absence de développement des souches de bières et de boissons non alcoolisées en milieu vin observé par Crauwels *et al.* (2017) ne provient possiblement pas de leur capacité à consommer les substrats carbonés en présence.

Comme *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* est capable, en conditions aérobies et en conditions non limitantes en substrat, de fermenter les sucres en éthanol et en acide acétique (Van Djiken et Scheffers, 1986 ; Rozpedowska *et al.*, 2011). Ce comportement est retrouvé sur la majorité des sucres étudiés. Néanmoins, pour certaines sources carbonées, des écarts de comportement sont observés. Un comportement Crabtree négatif est notamment observé en présence de galactose, comme remarqué par Moktaduzzaman *et al.*, 2015. Ce métabolisme, grâce à un rendement énergétique plus important, permet une accumulation de biomasse plus efficace, mais moins rapide dans les conditions testées. En présence de mélanges de glucose et de galactose, ce comportement peut être maintenu. Ainsi, la souche L0424 fermente le glucose, puis présente un métabolisme respiratoire en consommant le galactose. A l'inverse, la souche L0469 adopte un métabolisme fermentaire pour les deux sucres. De même, sur cellobiose, la souche L0424 emprunte un métabolisme strictement respiratoire, L0469 privilégiant un métabolisme fermentaire. Ces différences suggèrent des mécanismes de régulation différents en fonction des souches. Dans le vin, le galactose provient de la dégradation des parois pectocellulosiques du raisin, des parois cellulaires de la levure et est retrouvé sous forme monomérique dans le bois des barriques (Pellerin et Cabanis, 1998 ; Alanon *et al.*, 2009). Le cellobiose est libéré lors de la chauffe du bois des barriques (Blondin *et al.*, 1982). Ces deux sucres sont présents en faibles quantités (<100mg/L). Les capacités de certaines souches à les utiliser de manière plus efficace pour leur croissance pourraient se révéler être un avantage considérable pour le développement dans le vin.

De manière générale, les souches étudiées privilégient l'utilisation du glucose pour leur croissance, lorsqu'il est présent. Certains sucres comme le fructose et le mannose peuvent être utilisés en même temps, mais le tréhalose, le cellobiose, et le galactose ne sont utilisés qu'après raréfaction voire épuisement du glucose par la plupart des souches étudiées. La souche AWRI 1608 fait exception et consomme le tréhalose en même temps que le glucose, alors que la souche L0424 présente des phénomènes de répression par le glucose plus marqués que les autres quel que soit le mélange de substrats. Ceci suggère que, malgré des profils généraux de dégradation des sucres, certaines souches pourraient être plus efficaces pour se développer sur mélanges de substrats.

Nous verrons dans le chapitre suivant que dans le vin, le glucose le fructose et le tréhalose sont majoritaires dans les vins et pourraient donc être préférentiellement utilisés et parfois, simultanément.

Concernant les capacités de production de PVs, toutes les souches étudiées peuvent produire des phénols volatils quels que soient leur niveau de ploïdie et leur matrice d'origine. La production de phénols volatils semble donc être une caractéristique conservée de cette espèce. Crauwels *et al.* (2017) mettait récemment en évidence que les gènes DbPAD et DbVPR codant respectivement pour la cinnamate decarboxylase et la vinylphénol réductase étaient très conservés chez les 7 souches de vin, bière et boissons non alcoolisées étudiées. En milieu modèle, les capacités intrinsèques de production des 33 souches étudiées ne peuvent être reliées au groupe génétique d'origine ou à la matrice d'origine des souches. En effet, nous n'obtenons pas de comportements homogènes à l'intérieur des groupes génétiques.

A chaque profil de croissance observé (A, B ou C), on ne peut pas non plus associer des capacités intrinsèques de production similaires pour toutes les souches. Néanmoins, les profils de croissance semblent moduler fortement les quantités de phénols volatils produits. Les éléments défavorables à la croissance ou au maintien de la cultivabilité (oxygène, éthanol) sont toujours défavorables à l'accumulation des PVs, quel que soit le groupe génétique d'appartenance des souches ou leur matrice d'origine. Une diminution de la population cultivable n'a dans aucun des cas étudiés empêché la production mais a toujours entraîné une diminution des quantités globales produites. Notre étude ne permet néanmoins pas de dire si la production observée dans les cultures en « déclin » est associée à l'activité de cellules en état Viable Non Cultivable, les cinétiques de PVs n'étant pas assez précises et les populations totales n'ayant pas été déterminées.

Néanmoins, derrière ce phénotype globalement très conservé de capacité absolue à produire des PVs, il semble que certaines souches du groupe triploïde AWRI1499-like notamment présentent des capacités d'altération bien moins sensibles aux éléments limitants ou inhibiteurs potentiellement présents dans le milieu et notamment l'oxygène et l'alcool. Si à 14% d'alcool, les souches étudiées ne produisent quasiment pas de vinyls ni d'éthyl phénols, on note des différences de comportement entre les souches en présence de 12% d'éthanol. Notamment, la souche triploïde L0424 est capable de produire des quantités de 4EP supérieures au seuil de perception en milieu modèle (Chatonnet *et al.*, 1992). En utilisant un milieu (ou un vin), il pourrait donc être possible de mieux distinguer les comportements et potentiels d'altération des souches des différents groupes.

La nature des sucres présents et utilisés pour la croissance, quant à elle, ne module en rien les capacités de production, contrairement à ce que suggéraient Dias *et al.* (2003a). Ces auteurs

observaient, en effet, qu'en présence de tréhalose, la souche ISA1791 produisait des quantités de 4EP 10 fois inférieures à celles produites en présence de glucose.

La conversion des vinyl phénols en éthyl phénols est associée à la réduction de NADH. L'inhibition de la fermentation par effet Custer est associée aux difficultés de la cellule à régénérer le NADH en excès, à l'entrée en limitation en oxygène. Il a été suggéré que la conversion des composés vinyles en composés éthyles participerait au rétablissement de la balance d'oxydo-réduction (Fugelsang, 1997 ; Duckitt, 2012 ; Smith et Divol, 2016). Donc la limitation en oxygène devrait stimuler la formation de PVs. Or la diminution des vitesses spécifiques de synthèse d'éthyl phénols, observée lorsque l'on compare les cultures aérées et les cultures en limitation en oxygène, va à l'encontre de cette théorie.

De manière générale, les variations observées pour les profils de croissance obtenus lors des expériences en nanofermenteurs ainsi que l'expérience de suivi de la production de phénols volatils en culture non aérée montrent que la susceptibilité à la diminution voire à la disparition de l'oxygène dans le milieu est variable en fonction des souches. Chez *B. bruxellensis*, le manque d'oxygène est connu pour causer une inhibition transitoire de la fermentation, associée à des difficultés de maintien de la balance oxydo-réduction (Effet Custer, Scheffers, 1966). Cet effet n'a à l'heure actuelle pas été étudié sur un nombre important de souches, du moins dans les mêmes conditions (Blomqvist *et al.*, 2010 ; Galafassi *et al.*, 2011 ; Rozpedowska *et al.*, 2011 ; Capusoni *et al.*, 2016). Capusoni *et al.* (2016) remarquaient que deux souches présentaient des capacités fermentaires différentes en conditions limitantes en oxygène. Dans nos cultures, au vu de l'absence de données quant aux métabolites produits pendant les cultures, il est difficile de conclure sur les métabolismes mis en place par les différentes souches. Néanmoins, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'ajout d'accepteurs d'électrons externes (acétoïne, Tween 80, ergostérol), connus pour permettre le rétablissement de la balance oxydo-réduction en absence d'oxygène, sur le comportement des souches étudiées.

En conclusion, nous avons, dans cette étude, mis en évidence l'absence d'impact de la matrice d'origine et du niveau de ploïdie sur la capacité des souches à utiliser tel ou tel substrat pour leur croissance ou sur leur capacité à produire des phénols volatils. Il apparaît néanmoins que la nature du substrat en présence et surtout l'état polyploïde des souches pourraient moduler la tolérance au manque d'oxygène et induire de meilleures capacités d'adaptation en conditions difficiles notamment en présence d'éthanol, comme cela a pu être montré pour la tolérance aux sulfites.

Chapitre 3

*Evolution de la composition en sucres de vins rouges
du vignoble bordelais pendant la FML et l'élevage.*

*Evaluation du lien avec la production de phénols
volatils.*

A l'heure actuelle, les changements de la composition du vin en sucres autres que glucose et fructose au cours de la vinification (et particulièrement après la FA) ne sont pas bien connus. Réalisé dans la continuité des fermentations, l'élevage et en particulier la période du premier été de l'élevage sont décrits comme particulièrement propices au développement de *Brettanomyces bruxellensis* (Chatonnet *et al.*, 1992). Or, l'une des clés qui pourrait contribuer à favoriser le développement rapide de *B. bruxellensis* dans de nombreux vins, est sa capacité à utiliser de nombreux substrats carbonés comme substrats de croissance. En effet, les sucres résiduels présents en fin de FA, puis de FML et pendant l'élevage sont une source d'énergie pour les bactéries et les levures notamment pour les espèces d'altération.

Nous avons donc réalisé un bilan des glucides résiduels à différents stades de vinification. Cette étude a été menée en collaboration avec plusieurs domaines viticoles du vignoble bordelais sur des vins produits en chais (et non au laboratoire) et échantillonnés au cours de la fermentation malolactique et de l'élevage en barrique afin, dans un premier temps, de réaliser un état des lieux des mono- et disaccharides retrouvés dans le vin rouge. Parallèlement, les niveaux de population de *B. bruxellensis* et les concentrations en phénols volatils ont été mesurés. Puis, nous avons étudié les liens éventuels entre la composition en sucres des vins et leur contamination par *B. bruxellensis* et/ou leur altération par les EP. Comme décrit dans la revue bibliographie, après la FML, certains lots de vin peuvent être assemblés avant l'étape d'élevage en barrique et il n'a donc pas été possible d'étudier l'évolution de la composition d'un vin tout au long de l'année. En conséquence, notre expérimentation sera traitée en deux essais séparés : les vins en FML d'un côté, et les vins en élevage d'un autre.

1 Mise en place du dosage de sucres résiduels dans le vin

La méthode d'analyse de référence de l'OIV (Méthode OIV-MA-AS311-06, 2006, lyophilisation, silylation et analyse par chromatographie en phase gazeuse, d'après la méthode décrite par R. Triquet-Pissard, 1979) pour le dosage simultané des sucres résiduels dans les vins secs a été modifiée, afin de quantifier un plus grand nombre de sucres avec un temps d'analyse réduit. Nous pouvons ainsi mesurer, en une seule analyse, la concentration de 16 composés (oses, polyols, di et trisaccharides, [Tableau 27](#)), décrits comme présents dans le vin et jusque-là dosés par le biais d'une succession de méthodes chimiques ou chromatographiques (Pellerin et Cabanis, 1998). Dans un souci de simplification, il sera admis dans la suite du manuscrit que le terme générique de « sucres dans le vin » se réfère aux sucres ainsi qu'aux deux polyalcools (sorbitol et mannitol).

La méthode obtenue, décrite dans la partie Matériel et Méthodes, a été, pour chaque sucre, validée en milieu modèle, puis dans le vin (répétabilité, limites de détection, de quantification). La

réalisation de gammes de linéarité dans le vin ($0,96 < R^2 < 0,99$) a permis de déterminer les limites de quantification de la méthode. Le glucose et le fructose sont quantifiés ensemble, car le pic du fructose co-élue avec l'un des pics du glucose.

2 Composition en mono- et disaccharides des vins rouges en fermentation malolactique

2.1 Echantillonnage sur la période « fermentations »

En 2014, quatre châteaux ont participé à la campagne de prélèvement. Pour chacun, deux lots de vin rouge issus de raisins de cépages différents (un de Merlot et un de Cabernet-Sauvignon) ont été échantillonnés. En 2015, huit domaines viticoles (dont les 4 prélevés en 2014) ont été échantillonnés, à raison d'un lot (Cabernet-Sauvignon ou Merlot) par châteaux. Pour chaque lot, deux prélèvements ont été réalisés : en fin de FA puis en fin de FML. Au total, 32 échantillons ont été prélevés puis analysés. La [figure 60](#) résume les campagnes de prélèvements réalisées au cours de ces deux millésimes. Les différents lots varient donc non seulement en termes de cépage, de millésimes, d'origines géographiques, mais également en termes de pratiques de vinification (méthodes d'extraction, de macération, souches utilisées pour réaliser la FA et la FML).

Afin d'évaluer si les lots étudiés étaient contaminés par *B. bruxellensis*, sa présence (qPCR et étalements) ainsi que les concentrations en phénols volatils (SPME-GC-MS) ont été déterminés dans les échantillons ([Figure 60](#)). L'analyse des résultats a montré que les populations de *B. bruxellensis* étaient inférieures à 1 cell/mL et 1 UFC/mL à l'exception d'un échantillon (15 cell/mL en fin FA, 0 cell/mL en fin FML). D'autre part, les concentrations en phénols volatils étaient inférieures au seuil de détection de la méthode de dosage employée.

La composition en sucres résiduels a ensuite été analysée dans ces échantillons. Un échantillon sur 32 n'a pas pu être dosé et un second présentait des concentrations aberrantes, car très élevées dans certains oses (Glucose-Fructose > 3g/L) du fait d'un prélèvement réalisé avant la fin de la FA. La composition en sucres a donc été analysée sur 30 échantillons.

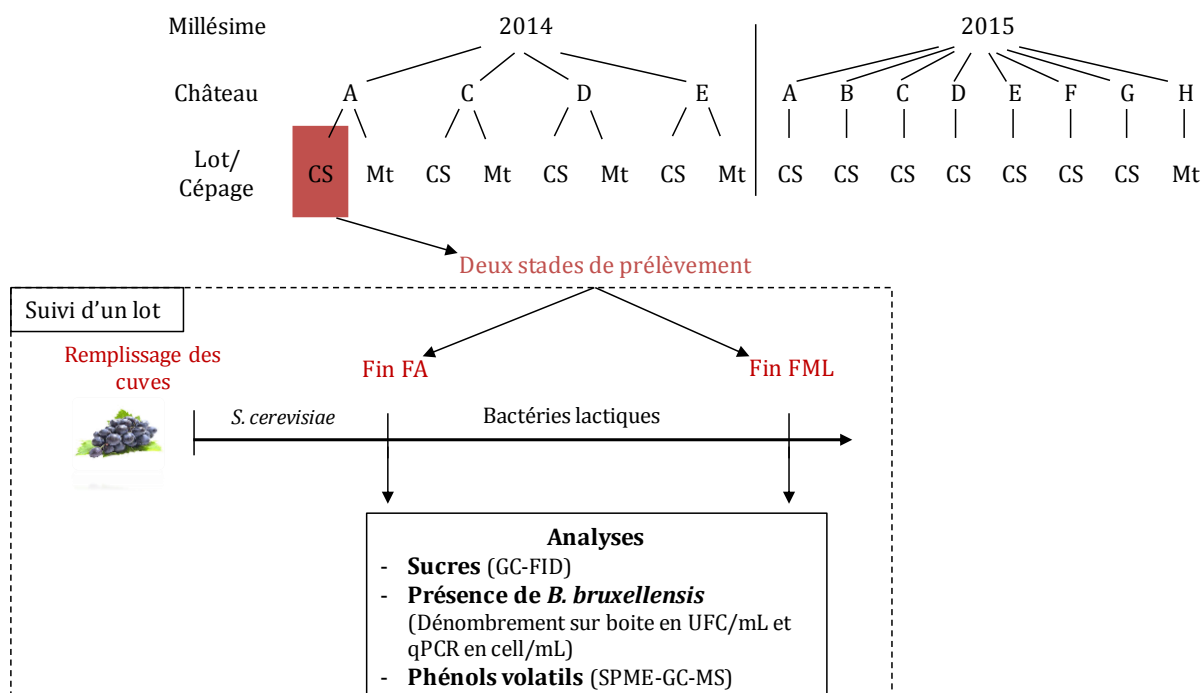


Figure 60: Campagnes de prélèvements réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge en fermentation.

Chaque lot correspond au vin contenu dans une seule cuve et provenant d'un seul cépage (CS : Cabernet-Sauvignon, Mt : Merlot). Chacun a été prélevé à deux stades. Le premier prélèvement a été réalisé à la fin de la fermentation alcoolique, avant l'égouttage. Puis le vin de goutte a été transféré dans une seconde cuve dans laquelle la FML a eu lieu. Les vins suivis n'ont pas subi d'assemblage avec un autre vin au cours de la FML. Un second prélèvement a été réalisé à la fin de fermentation malolactique.

2.2 Analyse globale

Les concentrations minimales, moyennes et maximales des sucres présents en fin de FA et de FML sont présentées dans le [tableau 27](#), page suivante.

Tous les sucres quantifiés par la méthode sont présents aux stades de vinification étudiés, à l'exception du mannose et du raffinose, dont les teneurs sont inférieures aux limites de détection de la méthode (1,3 et 1,1 mg/L respectivement). Les concentrations des sucres présents s'échelonnent de quelques mg/L à plusieurs centaines de mg/L de vin. Les sucres majoritairement présents en fin de fermentation alcoolique sont le glucose et le fructose (182 mg/L en moyenne), suivis du tréhalose (168 mg/L) (Tableau 27). Le mannitol et le sorbitol sont également présents en quantités de l'ordre de la centaine de mg/L en fin de FA. En fin de FML, le glucose, le fructose et le tréhalose sont également les plus abondants, mais leurs concentrations dans le vin à ce stade sont en moyenne inférieures aux quantités retrouvées en fin FA (113mg/L et 129mg/L en fin FML respectivement).

Tableau 27: Concentrations en sucres résiduels (GC-FID) à fin FA et fin FML dans des lots de vin rouge en mg/L.

	Fin FA			Fin FML		
	Moyenne	Min	Max	Moyenne	Min	Max
Hexoses						
D-Glucose + D- Fructose*	182 (\pm 152)	62	603	113 (\pm 22)	86	158
D-Galactose*	17 (\pm 2)	14	20	16 (\pm 4)	10	25
D-Mannose*	0	0	0	0	0	0
Pentoses						
L-Arabinose*	46 (\pm 38)	18	143	36 (\pm 27)	17	108
D-Ribose*	18 (\pm 11)	8	56	10 (\pm 5)	4	22
L-Rhamnose	53 (\pm 19)	28	86	87 (\pm 38)	32	169
D-Xylose*	12 (\pm 7)	2	24	8 (\pm 6)	0	22
Polyalcools						
Mannitol	76 (\pm 39)	21	147	81 (\pm 34)	39	147
Sorbitol	107 (\pm 30)	83	175	108 (\pm 31)	76	171
Disaccharides						
Lactose	47 (\pm 24)	23	110	42 (\pm 12)	24	73
Maltose*	10 (\pm 30)	6	15	8 (\pm 3)	4	14
Tréhalose*	168 (\pm 78)	67	322	129 (\pm 105)	4	413
Cellobiose*	40 (\pm 12)	24	65	38 (\pm 10)	24	66
Méliobiose*	19 (\pm 3)	15	26	19 (\pm 3)	15	25
Trisaccharide						
Raffinose	0	0	0	0	0	0
Total	797 (\pm 203)	489	1 193	670 (\pm 192)	420	1 024
Total des sucres potentiellement utilisables par <i>O. oeni</i>	512 (\pm 159)	276	832	380 (\pm 160)	211	778

*Sucres utilisés par *O. oeni* pour sa croissance en milieu modèle (d'après Cibrario *et al.*, 2016).

Nous allons tout d'abord étudier les modifications de composition en sucres associées à la FML. Puis, nous examinerons s'il existe d'autres facteurs pouvant expliquer la composition globale en sucres et la variabilité entre les échantillons.

2.3 Modifications de la composition en sucre associées à la FML

Nous allons essayer de répondre à la question : « *Est-ce que certains sucres sont significativement affectés par la réalisation de la FML ?* »

Afin d'analyser les résultats, il convient de bien schématiser les phénomènes en jeu. En effet, les oses et disaccharides présents aux stades de vinification étudiés sont d'origines multiples. Certains proviennent de la baie de raisin, d'autres des levures ou du bois. Quelle que soit leur origine, ils peuvent être sous forme libre ou sous forme « potentielle », car liés dans des polysaccharides ou des hétérosides. Les formes libres peuvent être quantifiées par notre méthode dès lors qu'elles se retrouvent dans le vin, alors que les oses ou oligosaccharides contenus dans les polysaccharides ou hétérosides du vin ne sont pas quantifiés par notre méthode. Néanmoins, ils peuvent être libérés tout au long du processus de vinification sous l'action des enzymes du

raisin, des enzymes ajoutées par le vinificateur ou libérées par les microorganismes présents (Kliewer, 1966 ; Conde *et al.*, 2015, Cuadros-Inostroza *et al.*, 2016) et ils seront alors quantifiés par notre méthode.

Parallèlement, les bactéries et levures présentes dans les vins en FML vont consommer une partie des sucres libres pour leur croissance. Des phénomènes de libération et de consommation de sucres (analysables par notre méthode) se superposent donc au cours de la période étudiée pour donner les variations observées.

Si l'on regarde les valeurs moyennes reportées dans le Tableau 27, on note une diminution de 16% en moyenne de la quantité totale des sucres dosés et de 26% de la quantité de sucres utilisables par *O. oeni*, principal acteur de la FML. En moyenne, 31% du glucose + fructose + tréhalose, sucres fermentescibles présents en fin FA disparaissent pendant la FML et la différence entre le total en sucres en fin FA et celui en fin FML (145 mg/L) est majoritairement lié à la disparition de ces 3 sources carbonées (108 mg/L). Parallèlement, il semble que la concentration de certains sucres augmente les deux stades (ex : rhamnose de 53 à 87 mg/L).

> Analyse individuelle des lots : phénomènes de disparition

La quantité totale de sucres qui disparaît pendant la FML varie de 4 à 535 mg/L selon le lot considéré. Les sucres contribuant à ces disparitions varient en fonction des échantillons, mais le glucose + fructose et le tréhalose sont majoritairement concernés par ce phénomène (Figure 61).

Dans les lots étudiés, les quantités de glucose + fructose et de tréhalose consommées s'échelonnent de quelques mg/L à 480 mg/L et 231 mg/L respectivement (Figure 62). De manière intéressante, lorsque glucose + fructose sont présents à des concentrations supérieures à 150 mg/L dans les échantillons en fin FA (quels que soient le château et le millésime), leur concentration décroît pendant la FML (lots E2, E5, E6, E13 et 14, Figure 62). Les quantités consommées s'échelonnent de 30 à 480 mg/L. En fin de FML, les concentrations résiduelles sont en moyenne de 100 mg/L. Une lecture plus poussée des chromatogrammes suggère que le fructose serait majoritairement concerné par cette disparition. Cette disparition n'est pas associée à l'apparition de mannitol, métabolite principal décrit pour *O. oeni* se développant sur fructose.

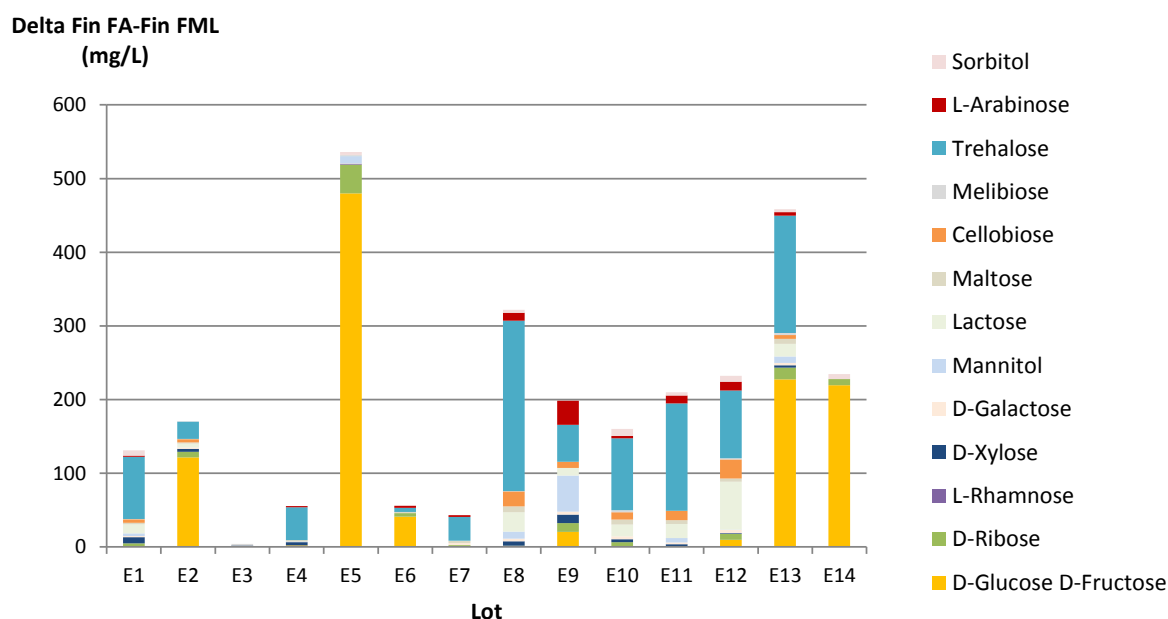


Figure 61: Distribution des quantités « disparues » de chaque sucre dans les lots entre la fin de la FA et la fin de la FML.

Les 14 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 et dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H). Seuls les sucres dont la concentration diminue en cours de FML sont pris en compte dans ce graphique.

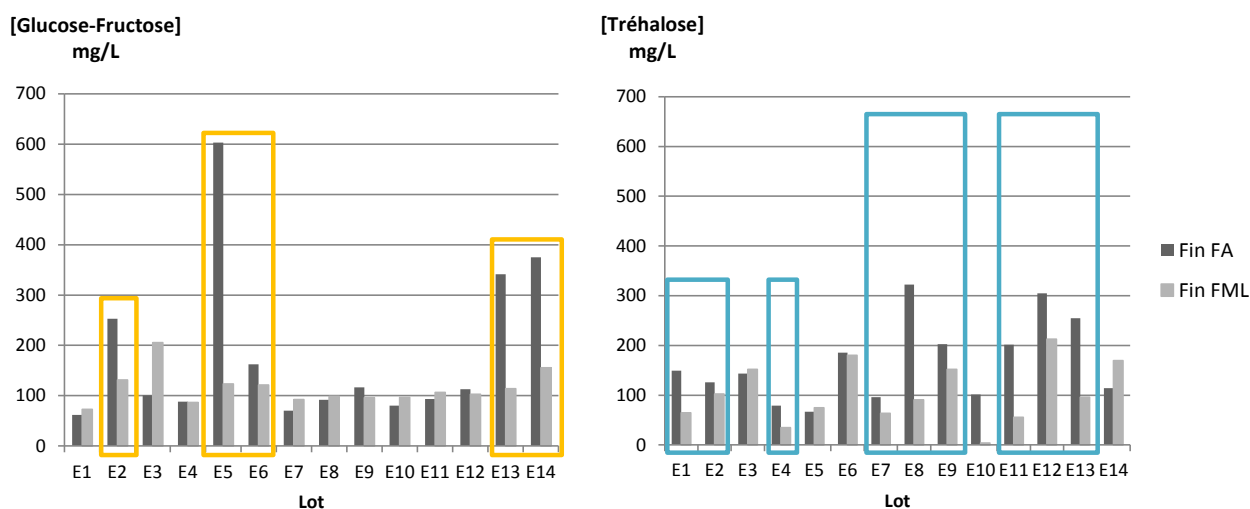


Figure 62: Concentrations en glucose+fructose (à gauche) et en tréhalose (à droite) en mg/L, avant et après la FML dans les 14 lots de vins rouges.

Ces 14 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 et dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H). Les encadrés mettent en évidence les lots pour lesquels le glucose-fructose (en jaune) ou le tréhalose (en bleu) disparaissent de façon significative au cours de la FML.

Dans certains lots, le tréhalose, disparaît également pendant la FML (Figure 62). Par exemple, dans le lot E8, pour 300 mg/L de tréhalose présent en fin FA, 200 mg/L sont consommés pendant la FML, alors que pour le lot 10, la totalité des 100 mg/L présents en fin FA est

consommée pendant la FML. A l'inverse, dans le lot 3, il n'y a pas eu consommation des 150 mg/L de tréhalose présents en fin FA, pendant la FML (F).

Il apparaît que, dans les lots contenant plus de 150 mg/L de glucose+ fructose en fin de FA, ceux-ci sont les sucres majoritairement consommés pendant la FML. A l'inverse, lorsque les concentrations en glucose + fructose sont inférieures à 150 mg/L en fin FA, le tréhalose est alors le principal sucre à disparaître pendant la FML (Figure 64). Ces phénomènes sont observés dans les vins inoculés avec des levains malolactiques comme dans ceux réalisant des fermentations spontanées, quelle que soit la durée de la FML (de 15 à 77 jours). Néanmoins, il convient de rester prudent car le nombre d'échantillons analysés pour chaque modalité est faible et les contrôles d'implantation des levains n'ont pas été effectués.

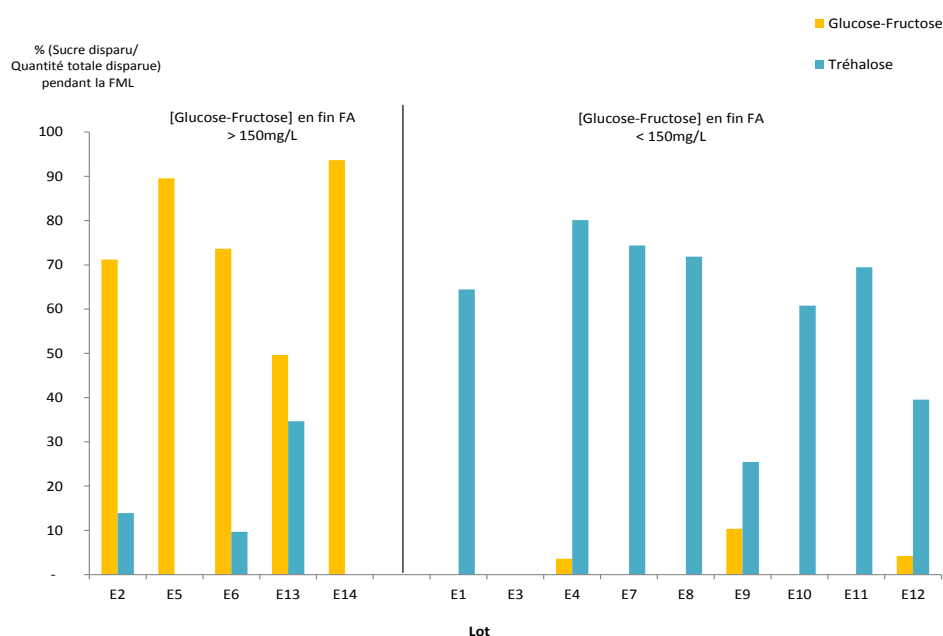


Figure 63: Contribution (en pourcentage) du glucose+ fructose ou du tréhalose à la diminution de la concentration totale de sucres pendant la FML.

Les 14 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 et dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H).

> Analyse individuelle des lots : phénomènes de libération

Le rhamnose est le principal sucre dont la concentration augmente pendant la FML (Figure 64). De plus, bien qu'en fin FA la concentration de rhamnose varie de manière importante entre les lots (28 – 86 mg/L), ce phénomène de libération est observé dans la majorité des lots (Figure 64, lots 1,2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 14). Les quantités libérées varient de 3 à 83 mg/L. On peut également observer que les concentrations en glucose et en arabinose augmentent de manière importante dans le lot 3. La concentration de tréhalose augmente également dans le lot 14.

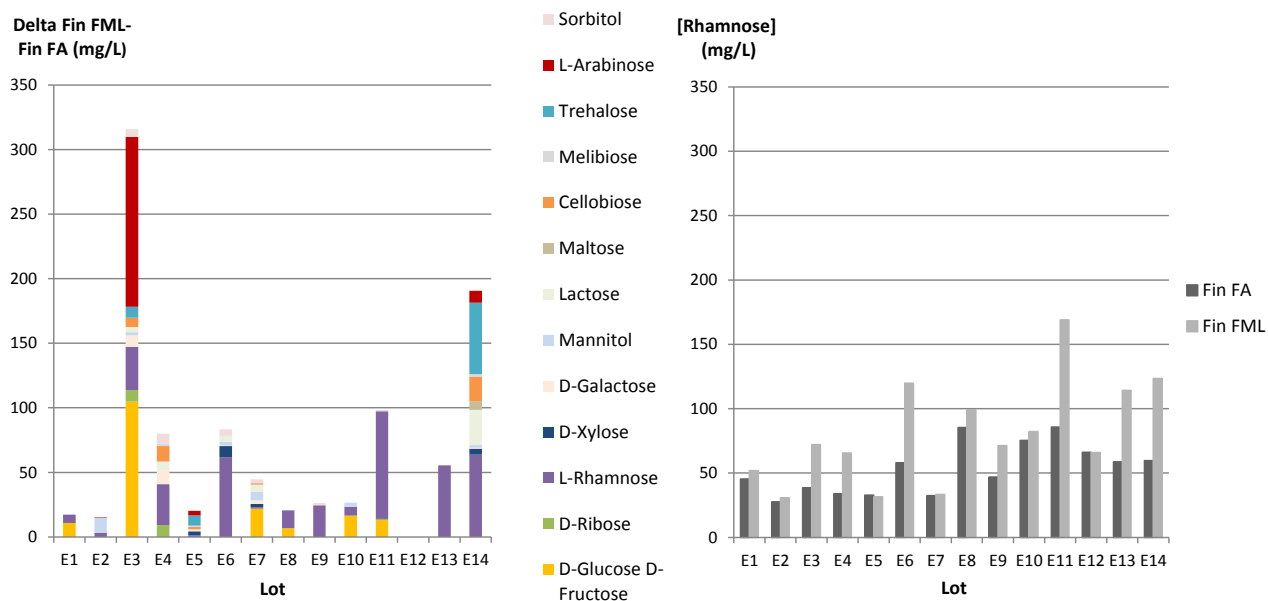


Figure 64: à gauche : distribution des quantités « libérées » de chaque sucre dans les lots entre les échantillons prélevés en fin FA et en FML ; à droite : concentrations en rhamnose (mg/L), avant et après la FML dans les 14 lots de vins rouges.

Ces 14 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 et dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H).

Néanmoins, ces évolutions visibles à la lecture des moyennes ou après analyse des comportements individuels des lots, bien que potentiellement intéressantes du point de vue gestion des fermentations et altération (voir discussion) auraient un impact mineur sur la composition globale des vins au stade fermentaire. Ainsi, l'observation des données par une ACP réalisée sur l'ensemble des échantillons complétée par une analyse statistique des données indique que le stade de prélèvement (avant versus après FML) n'a pas d'impact majeur sur la composition en sucres des échantillons (Kruskal-Wallis, p -value > 0,05). La teneur en maltose fait exception puisque, bien que très faible, elle est significativement plus élevée en fin FA qu'en fin FML (p -value < 0,05). Nous allons donc rechercher quels sont les paramètres déterminants la composition en sucres des vins au stade fermentaire, indépendamment du stade fin FA, fin FML.

2.4 Facteurs modulant la composition en sucres lots de vins étudiés aux stades fermentaires

Une analyse en composante principale a été réalisée sur l'ensemble des échantillons dosés (Figure 65, page suivante). Le cercle des corrélations pour les dimensions 1 (35% de la variabilité) et 2 (18%) suggère une corrélation positive importante entre certains sucres. Le rhamnose, les polyols et les disaccharides forment un premier groupe de variables corrélées et expliquent en partie la dimension 1. Les hexoses (Glucose, Fructose et galactose) et certains pentoses (arabinose, ribose et xylose) expliquent en partie l'axe 2. Les échantillons semblent principalement séparés en fonction de l'axe 1 et donc de leurs concentrations en disaccharides,

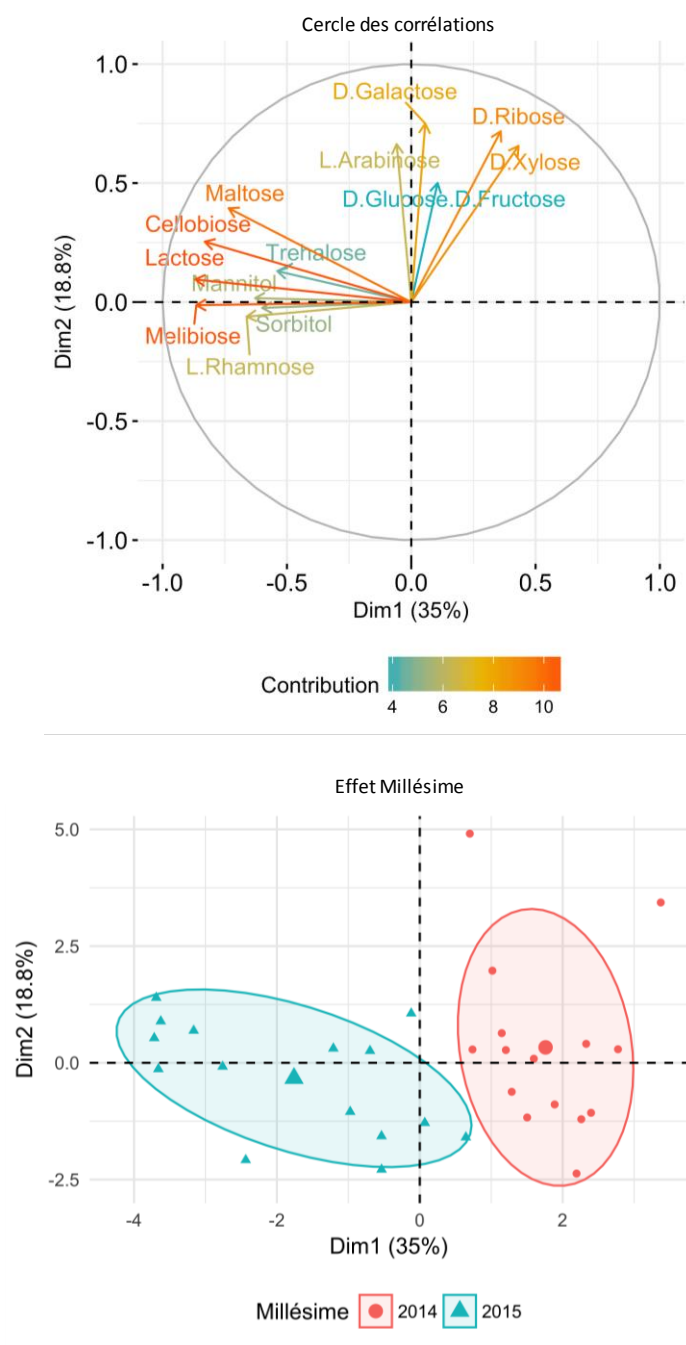


Figure 65 : Variabilité des échantillons de vin en fonction des concentrations de chaque sucre.

Sont représentés, pour les dimensions 1 et 2, le cercle des corrélations (en haut), et l'ACP, sur les dimensions 1 et 2 sur laquelle le millésime des échantillons est indiqué (2 niveaux de couleur). Les ellipses résument l'information relative au millésime des nuages de points : elles estiment avec un intervalle de confiance de 68% les coordonnées du barycentre (point de taille plus importante que les individus) relatif à chaque groupe et sont centrées sur ce point. Ces représentations ont été réalisées à l'aide du package factoextra du logiciel R. Sur les cercles des corrélations, les variables 'sucre' sont représentées par couleur, en fonction de leur contribution à la variabilité des échantillons dans les dimensions 1 et 2. Les échantillons représentés (30) proviennent de quatre châteaux (A à D) pour le millésime 2014 et de 8 châteaux (A à H) en 2015, à raison de deux lots par châteaux en 2014 et un lot par châteaux en 2015. Pour chaque lot, deux échantillons ont été prélevés.

polyols ou rhamnose. Certains échantillons (11 et 25) présentent également des concentrations en arabinose, glucose, ribose, galactose et xylose plus importantes que les autres échantillons. Les concentrations en mélibiose, lactose, cellobiose et maltose contribuent de manière importante à la variabilité des échantillons observée dans les dimensions 1 et 2 ([Figure 66](#), cercle des corrélations). L'ajout de la dimension 3 (12% de la variabilité) suggère une répartition similaire des échantillons et n'a donc pas été représentée.

Comme mentionné plus haut, le stade de vinification (fin FA ou fin FML) ne permet pas de séparer/regrouper clairement les échantillons. Nous avons donc étudié le regroupement des échantillons par millésime cépage et château.

2.4.1.1 Effet du millésime

Les échantillons ont été prélevés lors des millésimes 2014 et 2015. La variabilité entre les échantillons décrite sur la [figure 65](#) semble en partie expliquée par le millésime d'origine des échantillons ([Figure 65C](#)).

Les échantillons du millésime 2015 sont significativement plus concentrés en rhamnose, sorbitol et disaccharides (Cellobiose, lactose, maltose, mélibiose et tréhalose) que ceux du millésime 2014 (Kruskal-Wallis, p-value < 0,05). A l'inverse, les échantillons du millésime 2014 sont significativement plus riches en xylose et en ribose (p-value <0,05). La distribution des sucres dans les échantillons en fonction du millésime est présentée sur la [figure 66, page suivante](#).

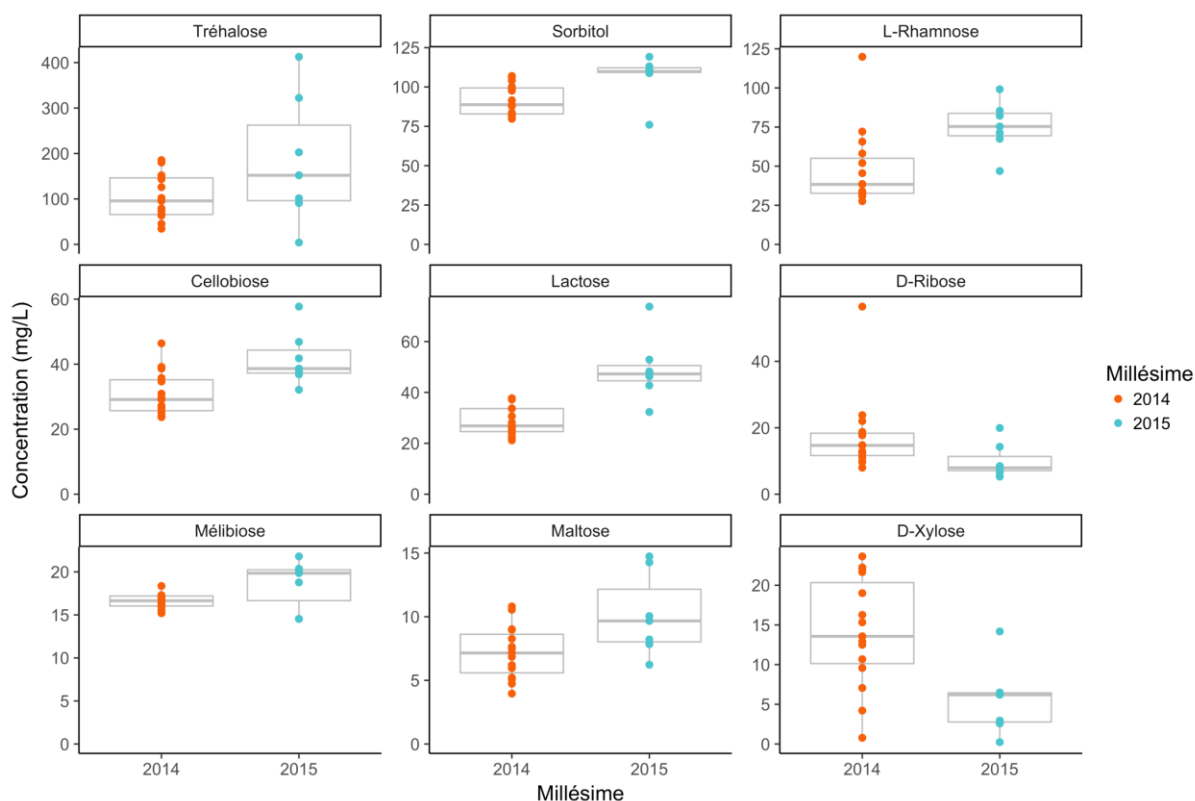


Figure 66: Distribution des concentrations en sucres en fonction du millésime d'origine de l'échantillon.

Les échantillons représentés (30) proviennent de quatre châteaux pour les millésimes 2014 et 8 (A à H) en 2015, à raison de deux lots par châteaux en 2014 et un lot par châteaux en 2015. Pour chaque lot, deux échantillons ont été prélevés.

Certains de ces sucres, tels que le rhamnose, le maltose, le sorbitol, le mélibiose, le lactose et le cellobiose sont issus du métabolisme de la vigne et de la dégradation des parois de la baie de raisin. Or, le métabolisme de la baie est modulé par les caractéristiques climatiques d'un millésime. En revanche, le tréhalose et le sorbitol sont principalement issus du métabolisme de la levure. Le tréhalose est libéré en fin de FA, lors de l'autolyse des cellules ; les quantités de tréhalose libéré dépendent donc des capacités de réserve des souches (*Saccharomyces* et Non-*Saccharomyces*) en présence et de leur métabolisme (pouvant entraîner un stockage plus ou moins grand de tréhalose et une lyse plus ou moins précoce et importante). Or, les vins produits en 2015 ne présentaient pas des pH ou des concentrations en éthanol significativement différents de ceux de 2014. D'autres caractéristiques du vin, associées au millésime, pourraient donc être en cause et expliquer ce changement de comportement des levures d'un millésime à l'autre.

2.4.1.2 Effet du cépage

En 2014, quatre châteaux ont participé à la campagne de prélèvement pour lesquels deux lots de vin rouge ont été suivis en fonction du cépage (un de Merlot et un de Cabernet-Sauvignon).

Nous avons donc évalué l'effet du cépage sur la concentration de chacun des sucres dosés dans les échantillons (Kruskal-Wallis). Le cépage des raisins n'a pas d'effets significatifs sur la concentration de la majorité des sucres étudiés, à l'exception du mannitol (p -value < 0,05). La [figure 67](#) montre en effet que, excepté pour le château E, la concentration en mannitol est 1,5 à 2 fois plus élevée dans les vins de Cabernet-Sauvignon que dans ceux de Merlot.

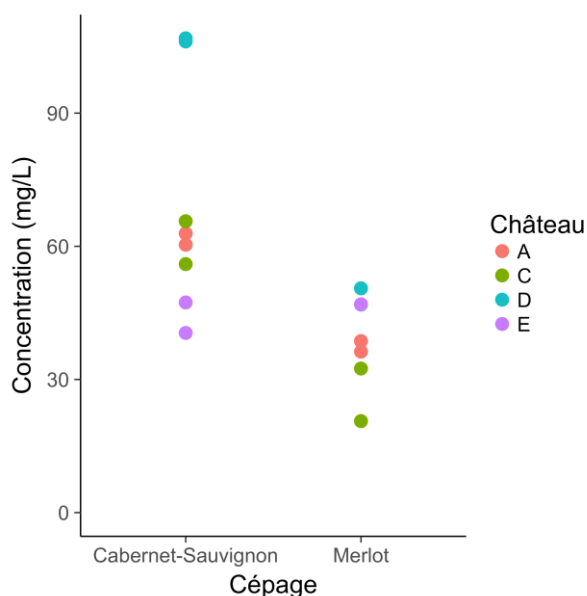


Figure 67: Concentrations en mannitol dans les échantillons de Cabernet-Sauvignon et de Merlot.

Ces échantillons ont été prélevés dans les châteaux W, X, Y et Z, lors du millésime 2014.

2.4.1.3 Effet du château

Les échantillons provenant de châteaux différents, l'importance du domaine prélevé sur la distribution de chaque sucre dans les échantillons a été évaluée (test statistique : Kruskal-Wallis). Sur les 13 sucres analysés, le domaine viticole d'origine influence significativement la concentration en sorbitol, en arabinose et en tréhalose (p -value < 0,05), ce que suggère également l'analyse visuelle des données ([Figure 68](#)). De manière intéressante, les échantillons du château A contiennent significativement plus d'arabinose que les échantillons des trois autres châteaux (p -value < 0,05). Ces échantillons sont également ceux qui présentent les concentrations totales de sucres les plus élevées.

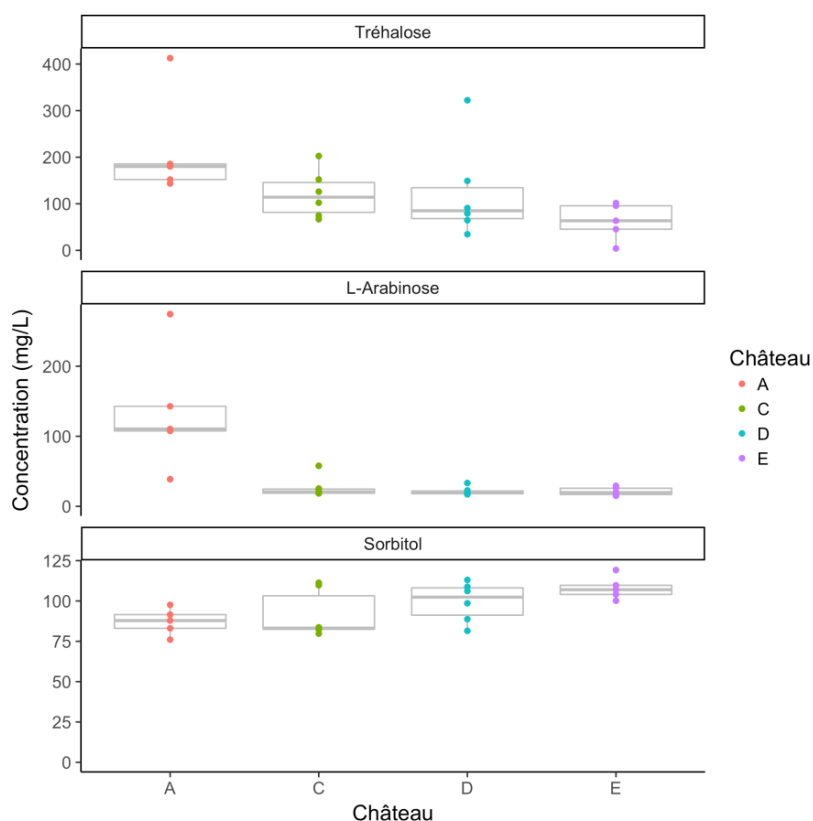


Figure 68: Concentrations en tréhalose, en L-arabinose et en sorbitol dans des échantillons de vin rouge en fin FA et en fin FML.

Ces sucres ont été dosés dans des échantillons provenant de quatre châteaux pour les millésimes 2014 et 2015, à raison de deux lots par châteaux en 2014 et un lot par châteaux en 2015. Pour chaque lot, deux échantillons ont été prélevés en fin FA puis en fin FML. Au total et pour chaque sucre, les concentrations dans 5 échantillons sont représentées pour A et E et 6 échantillons dans C et D.

2.5 Bilan sur les changements observés pendant la FML

Les analyses menées sur la période associée à la fermentation malolactique permettent de dégager quelques tendances : la première est, aucun des vins suivis ne contient de mannose ou de raffinose. Ensuite, chaque vin est différent en ce qui concerne la concentration totale et les proportions relatives de chaque sucre. Glucose+fructose et tréhalose sont les sucres les plus abondants, mais la FML tend à diminuer leurs concentrations, les bactéries consommant d'abord les plus abondants ; selon les cas, ce peut être le tréhalose ou le mélange glucose+fructose. Selon le château étudié, le vin sera plus ou moins riche en arabinose, et parfois en sorbitol et tréhalose. Le millésime permettra de moduler les proportions de sucres issus des polysaccharides du raisin (rhamnose, arabinose, xylose et disaccharides) mais aussi de tréhalose. Les vins de merlot contiennent moins de mannitol et sa présence serait exclusivement liée au métabolisme du raisin (pas de production pendant la FML).

3 Evolution de la composition du vin en mono- et disaccharides pendant le 1^{er} été de l'élevage en barrique

3.1 Echantillonnage et suivi sur le premier été d'élevage.

Les vins des millésimes 2014 et 2015, en élevage en barrique ont été prélevés pendant les étés 2015 et 2016 respectivement. Peu après la fin de la FML, les différents lots de vin obtenus ont été mélangés à d'autres lots pour constituer les vins assemblés destinés à être élevés en barriques pendant 12 à 18 mois.

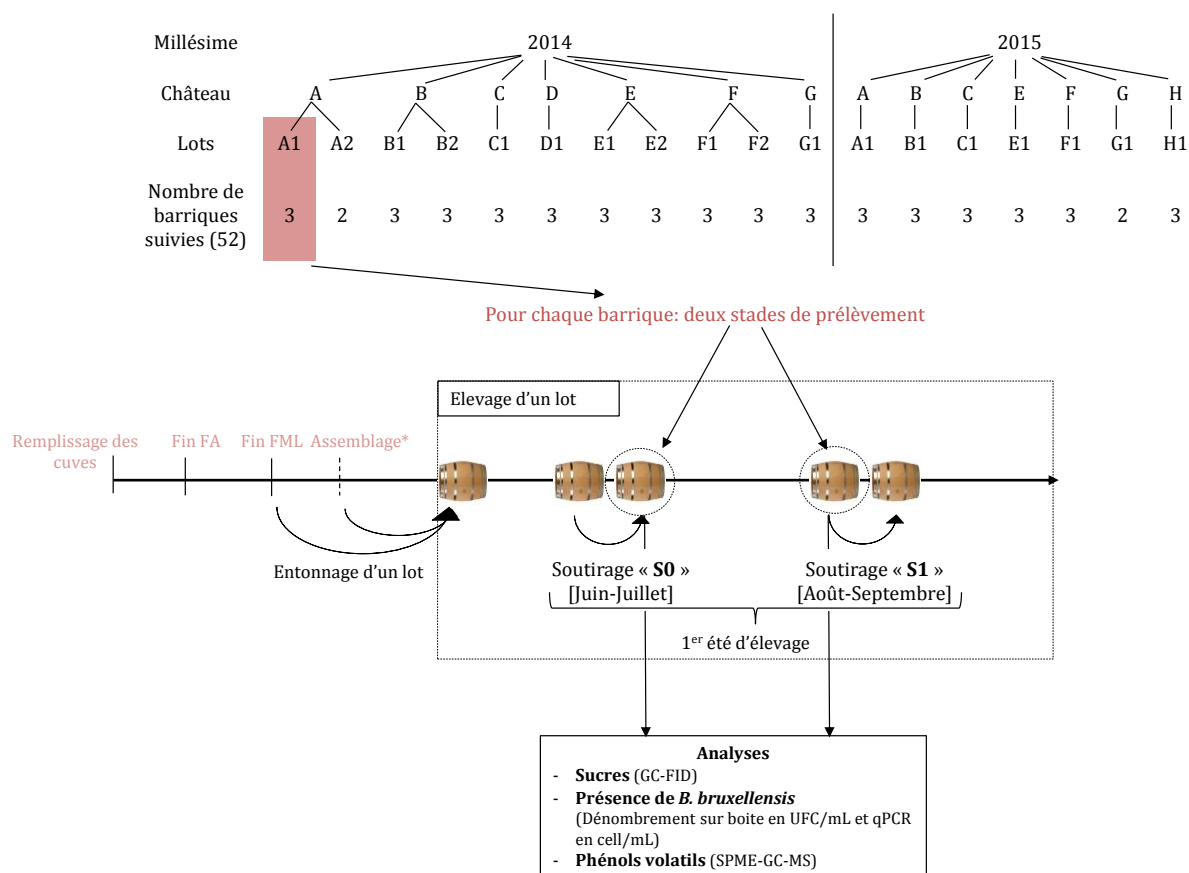


Figure 69: Campagnes de prélèvement réalisées en 2014 et en 2015 dans les châteaux A à H, pour le suivi de lots de vin rouge lors du 1^{er} été d'élevage.

Chaque lot correspond à un vin réparti dans plusieurs barriques. Pour chaque vin, 2 à 3 barriques ont été suivies. Dans chaque barrique, un échantillon de vin a été prélevé après le 1^{er} soutirage d'été (S0) puis un second échantillon a été prélevé avant le transfert du vin lors du 2nd soutirage d'été (S1).

Nous avons sélectionné 1 à deux vins assemblés par château et 2 à 3 barriques pour le suivi de chaque lot (ou vin assemblé, Figure 69). Il est à noter que les lots suivis peuvent être mono cépage ou contenir des vins provenant de plusieurs cépages (Merlot, Cabernet-Sauvignon, Cabernet-Franc) en proportions différentes selon les châteaux. Dans les châteaux considérés, après l'entonnage (ou mise en barriques réalisée entre Février et Avril), le vin est soutiré au

Tableau 28 : Concentrations en sucres résiduels (en mg/L) dans des vins en élevage, après le 1er (S0) et avant le second soutirage d'été (S1).

	S0				S1			
	Moyenne	Ecart-type	Min	Max	Moyenne	Ecart-type	Min	Max
Hexoses								
D-Glucose + D-Fructose	176	72	87	415	152	85	82	489
D-Galactose	19	6	12	38	19	6	12	40
D-Mannose	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentoses								
L-Arabinose	110	128	25	524	118	136	27	522
D-Ribose	15	6	5	31	14	7	4	33
L-Rhamnose	107	43	63	280	102	43	44	242
D-Xylose	14	8	4	39	14	7	4	41
Polyalcools								
Mannitol	83	27	28	123	85	27	45	130
Sorbitol	120	25	50	212	118	21	74	165
Disaccharides								
Lactose	36	7	22	52	35	7	21	47
Maltose	7	4	0	21	6	4	0	18
Tréhalose	94	73	6	250	86	68	5	240
Cellobiose	40	11	25	86	40	13	26	104
Méliobiose	22	4	17	32	22	4	17	36
Trisaccharide								
Raffinose	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	851	243	540	1675	823	257	533	1652

début de l'été (entre Mai et Juillet), puis transféré dans une barrique propre et sulfitée (Soutirage S0). Il y reposera pendant 2 à 3 mois avant d'être à nouveau transféré lors d'un second soutirage (S2) dans une autre barrique afin d'éliminer les lies ([Figure 69](#)). A chaque soutirage, des mélanges de vins des différentes barriques d'un même lot peuvent avoir lieu. De ce fait, afin de limiter les interférences liées aux mélanges, pour chaque barrique suivie, nous avons récupéré un échantillon juste après le transfert du vin dans la barrique propre (échantillon S0) puis un 2nd échantillon a été prélevé juste avant le transfert du vin dans une 2nd barrique (échantillon S1) lors du soutirage S1. La durée entre les deux prélèvements varie de 51 à 170 jours en fonction du lot et du château suivi, mais ne varie pas entre les barriques d'un même lot.

Au total, 52 barriques ont été suivies et 104 échantillons prélevés et analysés pour leur concentration en sucres, leur population en *B. bruxellensis* (qPCR et dénombrement sur milieu sélectif gélosé) et leur concentration en phénols volatils. La [figure 69](#) résume les campagnes de prélèvement réalisées au cours de ces deux millésimes.

3.2 Identification et quantification des oses présents

Les concentrations moyennes en sucres résiduels dosés dans des vins échantillonnés à S0 puis à S1, tous lots et châteaux confondus sont résumées dans le [tableau 28](#).

Les sucres identifiés pendant les fermentations sont également présents lors de l'élevage. Les concentrations sont de l'ordre du mg/L et s'échelonnent de quelques mg/L à plusieurs centaines de mg/L de vin. Les sucres majoritairement présents lors de ces deux stades sont le **glucose + fructose**, l'**arabinose**, le **rhamnose**, les **polyols** et le **tréhalose** ([Tableau 28](#)). Conformément aux résultats obtenus sur la période fermentation nous n'observons pas de mannose ni de raffinose dans nos échantillons.

Existe-il des différences pour certains sucres entre les concentrations moyennes retrouvées en fin FML et celles obtenues pendant l'élevage ?

La comparaison des concentrations obtenues en fin de FML et en élevage (S0) montre que les échantillons de ces deux stades sont significativement différents, en ce qui concerne les concentrations de **D-glucose+D-fructose**, **L-arabinose**, **D-ribose**, **L-rhamnose** et **D-sorbitol** (Kruskal-Wallis, p-value < 0,01) : nos échantillons de vin en élevage pris en début d'été sont globalement plus concentrés que ceux pris en fin FML.

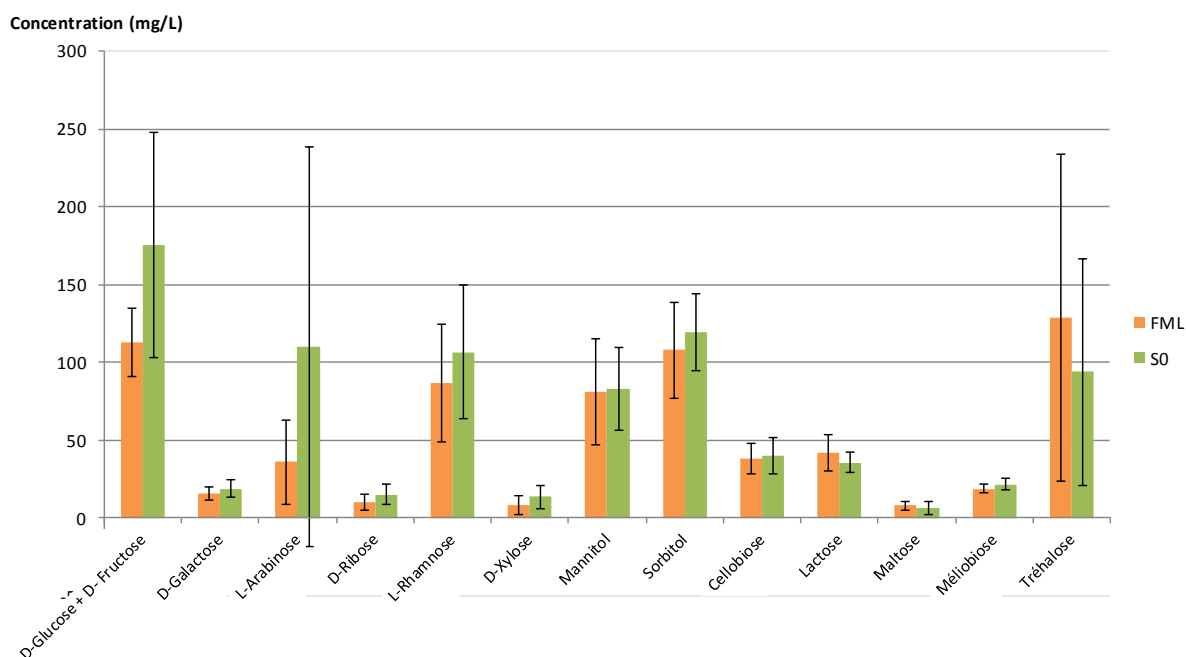


Figure 70: Concentrations moyennes des sucres résiduels présents dans les échantillons en fin de FML et en élevage.

Ces échantillons sont issus des vins en fin de FML ou en élevage des millésimes 2014 ou 2015 dans un des 8 châteaux A à H. Les vins prélevés pendant l'élevage ne sont pas les mêmes lots que ceux prélevés pendant la vinification.

Les écarts types sont importants car, comme au moment des fermentations, les vins étudiés sont très différents d'un lot à l'autre. Néanmoins, la tendance décrite sur la [figure 70](#) est bien retrouvée lorsque l'analyse est réalisée château par château: exemple avec les teneurs en glucose+fructose et arabinose pour les châteaux A, C, E et F comparés par une ANOVA à deux facteurs ([Figure 71](#)). Sur ces 4 châteaux, les concentrations en glucose+fructose et arabinose sont significativement différentes en fonction du château, du stade et de la combinaison des deux facteurs (p-value < 0,05).

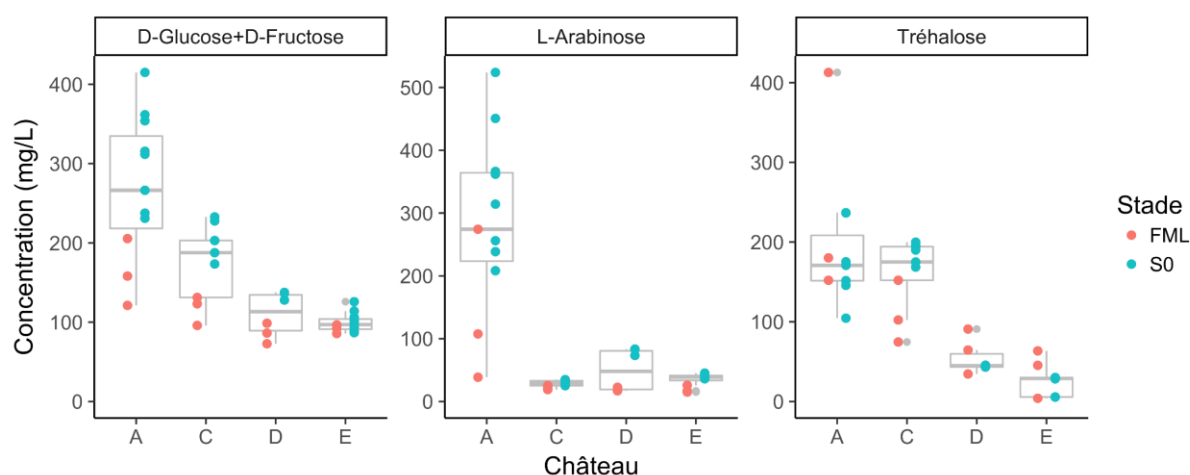


Figure 71: Distribution des concentrations en D-glucose-D-fructose, L-arabinose et tréhalose en fonction du château et du stade de prélèvement de l'échantillon.

Les prélèvements proviennent des châteaux A, C, D et E, millésime 2014 et 2015 confondu et tous lots confondus pour les stades FML et S0 (Elevage début été).

Comme cela était observé en fin de FML, les échantillons en élevage du château A sont, sur les deux millésimes étudiés, plus concentrés en arabinose que ceux des autres châteaux. Les concentrations en arabinose sont également plus importantes dans les échantillons des châteaux D et E en élevage (versus FML). Dans les châteaux A, C et D, les concentrations en glucose-fructose varient et sont plus élevées dans les échantillons en élevage que dans ceux prélevés en fin de FML. Ce phénomène n'est pas retrouvé pour le tréhalose.

L'origine de cet enrichissement pourrait être la libération de sucres à partir de formes liées (hétérosides et polysaccharides) ou le transfert de sucres à partir du bois des barriques.

3.3 Facteurs affectant la variabilité entre les échantillons

Nous avons choisi de travailler sur les 6 châteaux communs à 2014 et 2015 sur les lots A1, B1, C1, E1, F1 et G1 (Figure 69). Un total de 68 échantillons a donc été analysé.

L'effet de chaque facteur (château, millésime et stade de prélèvement) ainsi que de leur combinaison sur les concentrations de chaque sucre a été observé par ANOVA à plusieurs facteurs (type1, différents ordres testés) (Tableau 29). Les facteurs ayant le plus d'effet sont le château et le millésime et une interaction entre ces deux facteurs est également à noter. Le stade de prélèvement ne modifie pas les concentrations de façon significative, ce qui suggère une évolution très lente et surtout lot spécifique de la composition en sucres du vin en élevage, sauf peut-être au niveau des concentrations en glucose+fructose. Ce point sera approfondi en fin de chapitre et mis en relation avec la production d'éthyl-phénols.

Les concentrations de **galactose, ribose, lactose** et **mannitol** varient de manière très significative (p -value < 0,001) en fonction du millésime (Tableau 29). Galactose, ribose et lactose sont des composés peu abondants dans les vins étudiés. Le millésime modifie aussi de façon significative les concentrations de cellobiose, xylose et rhamnose. Ces différences étaient déjà visibles aux stades fermentaires sur les vins mono-cépage : le millésime affecte donc principalement des sucres apportés par le raisin.

Tableau 29 : Effets des facteurs château, millésime et stade et de leur combinaison sur la concentration des sucres dans des échantillons de vin en élevage

Résultats d'ANOVA à plusieurs facteurs, Rcmdr. CM : Château-Millésime, CS : Château-Stade, MS : Millésime-Stade, CMS : Château-Millésime-Stade.

	Millésime	Château	Stade	CM	CS	MS	CMS
Glucose+Fructose		***	**	*	*		
Galactose	***	***		*			
Ribose	***	***		***			
Xylose	*	***					
Arabinose		***					
Rhamnose	*						
Mannitol	***	***		*			
Sorbitol		***		***			
Cellobiose	*	***		**		*	
Lactose	***	***		***		*	
Maltose		***		**			
Mélibiose		***		***		*	
Tréhalose		***		***			

* : p -value < 0,05

** : p -value < 0,01

*** : p -value < 0,001

Le château d'origine influence de manière significative la concentration et les proportions de tous les sucres (excepté le rhamnose) (Tableau 29). Les concentrations de chaque sucre en fonction des châteaux (tout échantillons confondus) sont présentées sur la Figure 72. Les concentrations de certains sucres (tels que le D-glucose+D-fructose, le L-arabinose, le mannitol, le sorbitol ou le tréhalose) peuvent varier d'un facteur 2 à 10 en fonction du château. Les concentrations en arabinose sont en moyenne 10 fois plus importantes dans les châteaux A et G, par exemple. Les concentrations en tréhalose sont également en moyenne 4 fois plus importantes dans châteaux A et C comparativement aux autres châteaux.

Autrement dit, les échantillons du château A sont significativement différents de ceux prélevés dans les autres châteaux : ils présentent des concentrations plus élevées pour la majorité des sucres dosés, à l'exception du rhamnose (pas de différences significatives) et du mannitol et du sorbitol (significativement moins concentrés, p -value < 0,05). Les échantillons du château G sont également significativement différents et plus concentrés en arabinose, ribose, xylose, galactose et mélibiose (Figure 72).

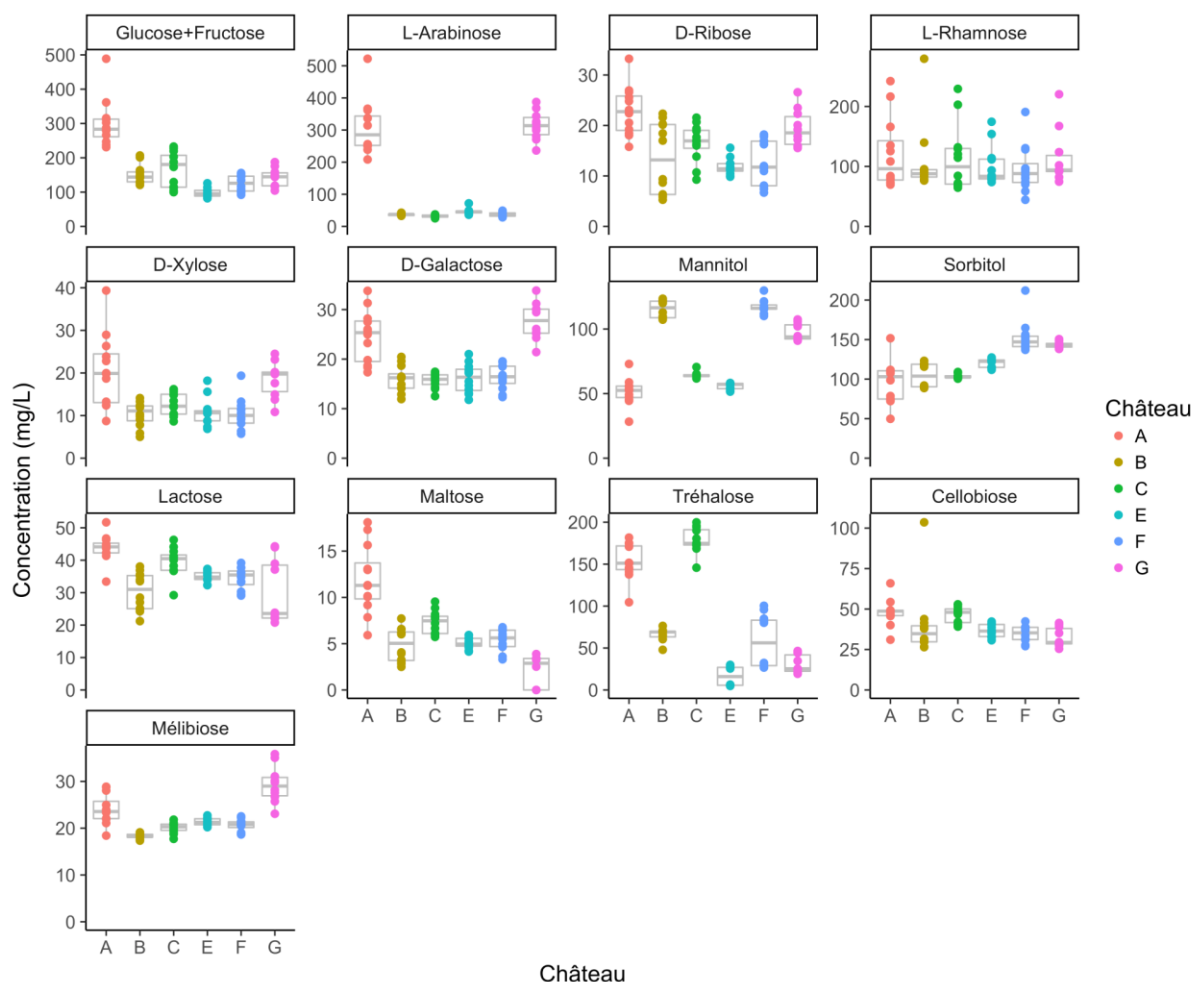


Figure 72: Distribution des concentrations en sucres en fonction du château d'origine de l'échantillon.

Les 68 échantillons représentés proviennent de six châteaux (A, B, C, E, F, G) échantillonnés lors des millésimes 2014 et 2015 aux stades S0 et S1.

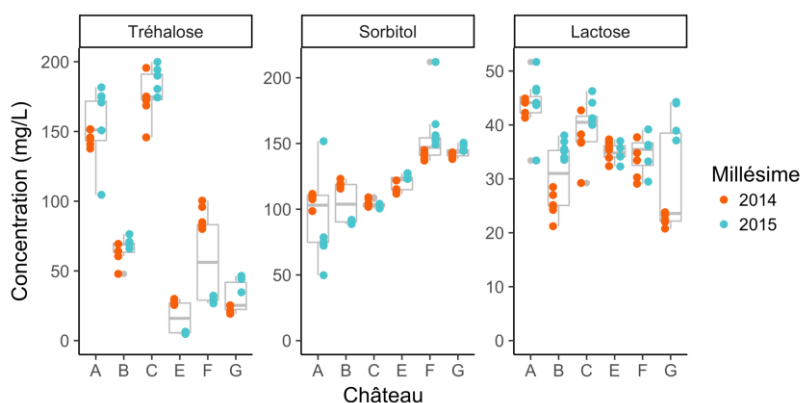


Figure 73: Distribution des concentrations en sucres en fonction du millésime de l'échantillon.

Les 68 échantillons représentés proviennent de six châteaux (A, B, C, E, F, G) échantillonnés lors des millésimes 2014 et 2015 aux stades S0 et S1.

Une interaction entre le château et le millésime du prélèvement est également retrouvée pour un nombre important de sucres (Tableau 29). Il existe donc, pour certains sucres et certains châteaux, des variations de concentrations significatives d'un millésime à l'autre (Figure 73).

> Analyse globale

Nous avons ensuite, observé la variabilité tous sucres confondus, par une analyse en composante principale (Figure 74). Les dimensions 1 et 2 expliquent respectivement 39,2% et 23,1% de la variabilité. Les disaccharides (à l'exception du mélibiose) forment un premier groupe de variables et le xylose, l'arabinose, le galactose et le mélibiose forment un second groupe de variables, inversé par rapport au premier. Les variations en glucose+fructose et ribose expliquent en partie l'axe 1. Les concentrations de arabinose, galactose, xylose, mélibiose et tréhalose et dans une moindre mesure les concentrations de lactose, cellobiose, maltose contribuent de manière importante à la variabilité des échantillons observée dans les dimensions 1 et 2 (Figure 74, cercle des corrélations). Le sorbitol et le mannitol sont à part et expliquent en partie les axes 1 et 2. L'ajout de la dimension 3 (9,4% de la variabilité) suggère une répartition similaire des échantillons et n'a donc pas été représentée.

Conformément à ce que suggérait l'analyse des concentrations de sucres prises une à une, les échantillons des châteaux A et G présentent des profils plus proches entre eux et séparés des autres châteaux d'après l'analyse des profils complets (Figure 74, Château). Dans ces deux châteaux, les échantillons sont également séparés en fonction du millésime (Figure 74, Château-Millésime). L'analyse de cette figure ne suggère pas de lien entre la zone géographique dans laquelle se situe le château et le profil de sucres présents : ainsi les châteaux E, F et G, très proches géographiquement ne sont pas groupés.

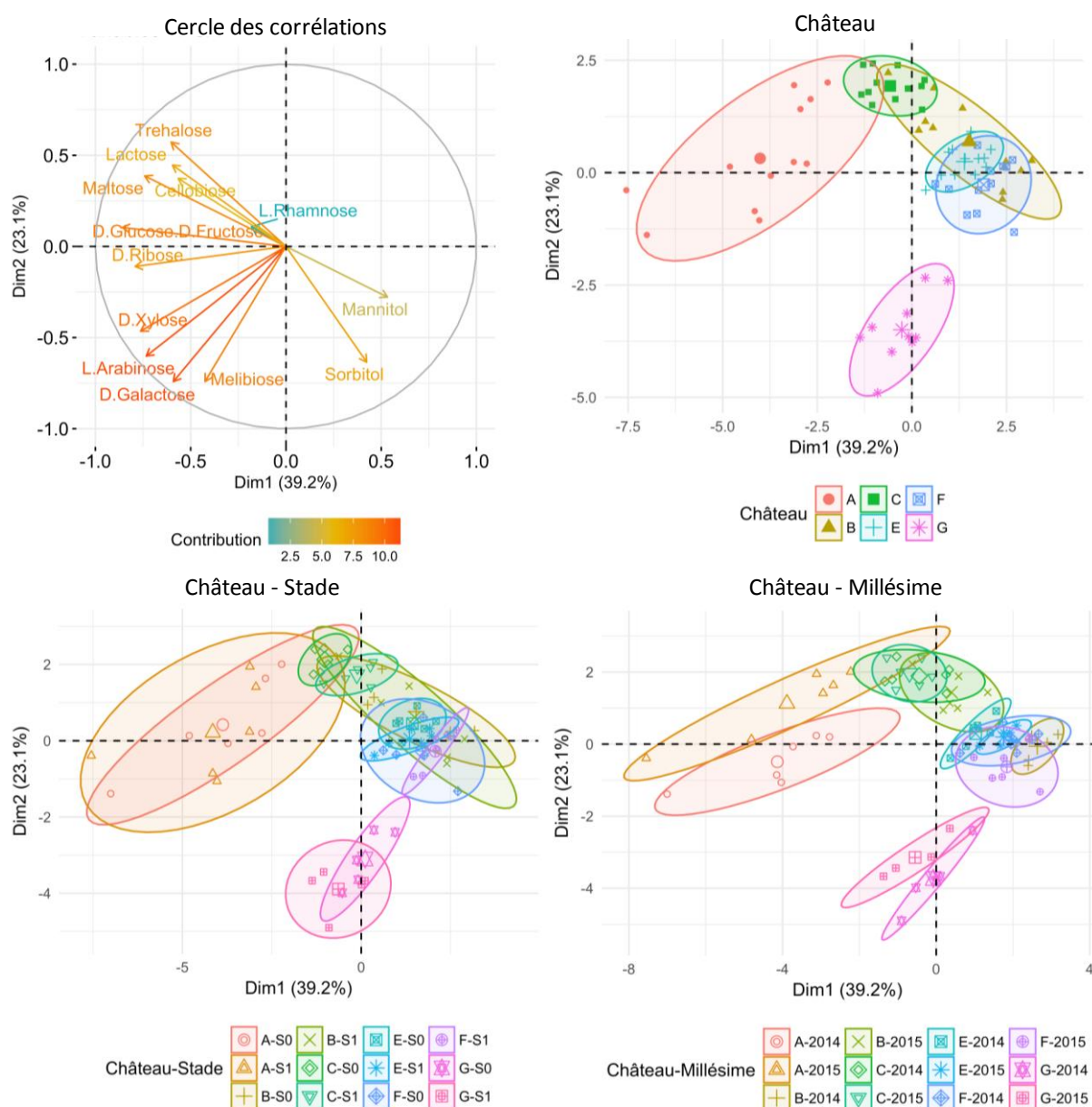


Figure 74 : Variabilité des échantillons de vin en élevage en fonction des concentrations de chaque sucre.

Le cercle des corrélations (en haut à gauche) est représenté pour les dimensions 1 et 2. Les variables sucres sont représentées en fonction de leur contribution à la variabilité des échantillons dans les dimensions 1 et 2. Les 68 échantillons représentés proviennent de six châteaux (A, B, C, E, F, G) échantillonnés lors des millésimes 2014 et 2015 aux stades S0 et S1. Les trois autres figures représentent les individus séparés dans les dimensions 1 et 2 par ACP, réalisées à l'aide du package factoextra du logiciel R. En haut à droite, les échantillons ont été représentés en fonction de leur château d'origine (ellipses positionnées à 68% d'intervalle de confiance). Ils ont également été représentés en fonction de leur château et du stade de prélèvement (S0 ou S1), ainsi que en fonction du château et de leur millésime

3.4 Modifications de la composition en sucres observées entre deux soutirages pendant le premier d'été d'élevage

Pour 3 des 52 barriques suivies, un des deux échantillons n'a pas pu être récupéré. En conséquence, l'étude des variations a été réalisée sur 49 barriques, tous lots confondus. Parmi ces 49 barriques suivies, certaines voient leur concentration totale en sucre augmenter, d'autres diminuer entre les deux stades. Ces évolutions sont la somme des variations de chaque sucre dans la barrique pendant la période de l'élevage d'été. **Elles ne sont pas fonction des lots, des châteaux ou des millésimes.** De la même manière qu'en fermentation, l'observation visuelle des données révèle qu'il n'existe pas de profil général d'évolution des concentrations en sucre pendant cette période de l'élevage. Pour compléter cette analyse, la [figure 74, Château-Stade](#) suggère que, excepté pour le château C, les échantillons n'apparaissent pas séparés en fonction de leur stade de prélèvement, S0 ou S1.

Néanmoins, nous avons, pour chaque barrique, analysé les sucres dont la concentration diminue et ceux dont la concentration augmente entre S0 et S1.

> Phénomènes de libération

Dans 33 des 49 barriques, la concentration totale de sucres analysée augmente : cette augmentation varie de 2 et 308 mg/L et résulte de la balance entre les sucres dont la concentration augmente et de ceux dont la concentration diminue. Le **rhamnose** et l'**arabinose** sont les sucres dont la concentration augmente le plus et/ou le plus fréquemment (21 lots sur 49 et 37 lots sur 49 respectivement) entre les deux soutirages d'été, suggérant des phénomènes de libération dans les vins ([Figure 75](#)). Les quantités libérées varient entre 4 et 160mg/L. On peut également observer que les concentrations en **glucose** augmentent de manière importante (8 - 130mg/L) dans certains lots (E16, E20, E45, E46). Certains lots voient également leur quantité de **cellobiose** et de **mélibiose** augmenter.

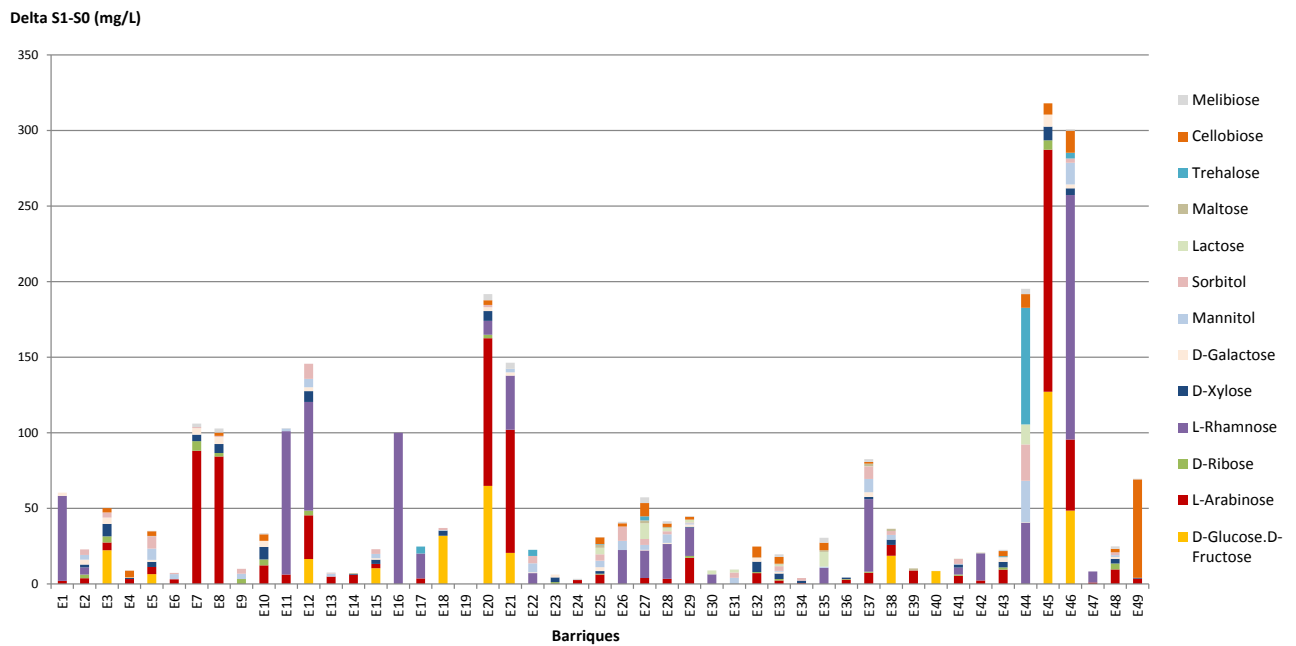


Figure 75: Distribution des quantités « libérées » de chaque sucre dans les lots entre S0 et S1.

Les 49 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H).

> Phénomènes de disparition

Dans 16 des 49 barriques suivies, la concentration totale de sucre diminue de 5 à 308 mg/L. Les sucres contribuant à ces disparitions varient en fonction des échantillons mais le **glucose+fructose** et le **rhamnose** sont majoritairement concernés par ce phénomène (39 et 28 échantillons concernés respectivement (Figure 76). Dans les barriques étudiées, les variations de ces deux sucres s'échelonnent de quelques mg/L à 130 mg/L et 187 mg/L respectivement. Le **tréhalose** disparaît également dans la majorité des échantillons (42/49 entre 8 et 48 mg/L).

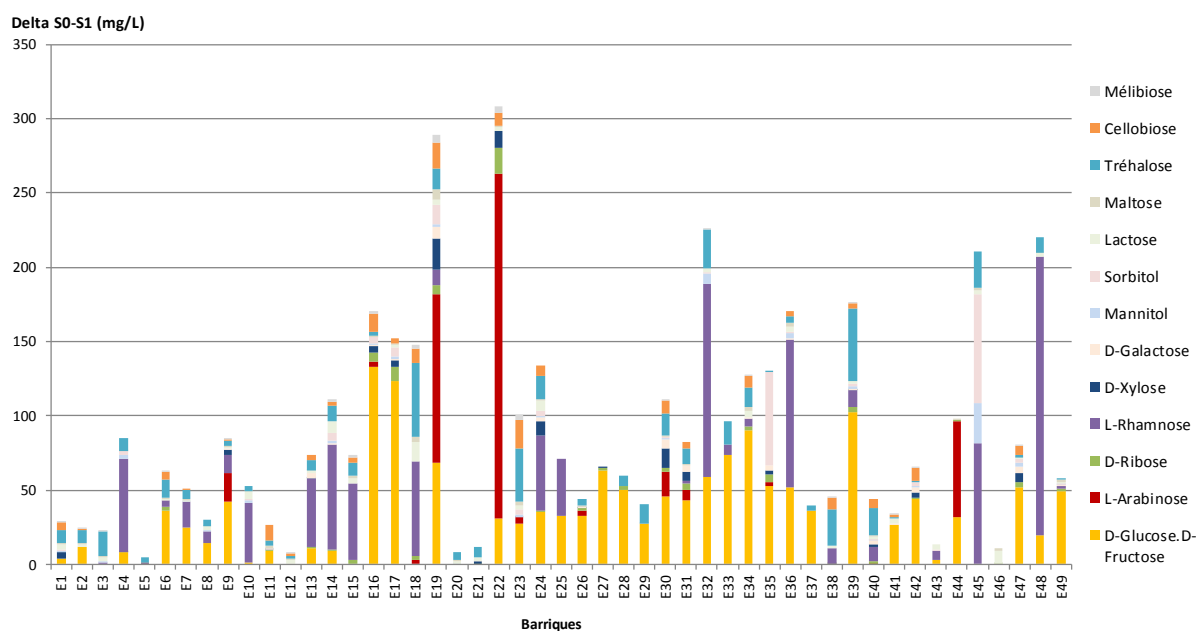


Figure 76: Distribution des quantités « disparues » de chaque sucre dans les lots entre S0 et S1.

Les 49 lots ont été suivis sur les millésimes 2014 ou 2015 dans l'un des 8 domaines viticoles (A à H).

Le fait que la concentration de rhamnose (mais aussi de glucose, tréhalose, arabinose) puisse selon les barriques, soit augmenter, soit diminuer suggère qu'il n'est pas possible, à partir de ces seuls dosages, de savoir quelle quantité de sucres a réellement été consommée. Ces quantités sont très certainement largement sous-estimées et sûrement de façon variable d'un vin à l'autre.

4 Existe-t-il un lien entre les profils en sucres des vins et la production de phénols volatils pendant l'élevage en barrique ?

4.1 Analyse de l'altération par les phénols volatils par rapport à la contamination par *Brettanomyces bruxellensis*

Parmi les barriques échantillonnées, certaines étaient contaminées c'est-à-dire positives pour la présence de *B. bruxellensis* et/ou altérées c'est-à-dire associées à la présence de phénols volatils. Sur l'ensemble des châteaux échantillonnés (8 au total), seul le château A ne présente jamais de population contaminante. Pour tous les autres, au moins deux barriques de chaque lot étaient contaminées par *B. bruxellensis* en S0 ou en S1 (39 contaminés sur 49 suivies). La période du premier été d'élevage est donc bien associée à la présence de *B. bruxellensis* en barrique même si parfois, les niveaux de contamination relevés sont très bas. Les populations présentes s'échelonnent de 10 cell/mL (seuil de détection par qPCR) à près de 3.10^3 cell/mL. Les populations cultivables retrouvées (UFC/mL) sont du même ordre de grandeur.

A S0, les lies ont été retirées et le vin réintroduit dans une barrique propre pour constituer un mélange homogène. Les prélèvements réalisés en milieu de barrique sont donc représentatifs de l'ensemble de la barrique. Au moment du prélèvement S1, le vin a reposé pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Les levures, microorganismes « lourds », ont sédimenté et un gradient de population s'est établi dans la barrique (Renouf, 2006). Les populations retrouvées en milieu de barrique ne sont donc plus représentatives de la population totale. Il est donc impossible de réaliser un suivi de croissance sur la période. A S0, sur les 49 barriques suivies, 32 barriques étaient contaminées. Les 7 autres étaient négatives à S0 mais positives en S1. Toutes les barriques positives en S0 restaient positives en S1. Dans 3 des barriques suivies, la population augmentait même de façon significative. Cela suggère donc que cette période peut être associée sinon au développement systématique du moins à la survie de *B. bruxellensis* en barrique. De plus, 7 barriques supplémentaires par rapport à S0 ont été identifiées comme positives à S1 (32 + 7 soient 39 barriques contaminées à S1).

Sur ces 39 barriques contaminées, 37 présentaient des concentrations en phénols volatils détectables à S1(PVs). Dans 35 d'entre elles, les concentrations en PVs augmentaient entre S0 et S1 suggérant que cette période est également associée à l'altération des vins rouges en barrique. Au final, dans les barriques altérées, les concentrations finales en PVs s'échelonnaient de quelques dizaines à 600 µg/L de 4EP+4EG.

Lorsque non nulles, les quantités produites (delta S1 – S0) variaient de 14 µg/L à 251 µg/L par barrique. Au moins en partie pour les problèmes d'homogénéité des levures dans les

barriques évoquées ci-dessus, il n'y a aucun lien entre l'évolution des populations viables ou cultivables et la production d'éthyl phénols entre S0 et S1. Celles-ci ne sont pas non plus corrélées à la durée de la période entre les deux prélèvements : les quantités produites sont parfois aussi importantes en deux qu'en 3 mois (Figure 77).

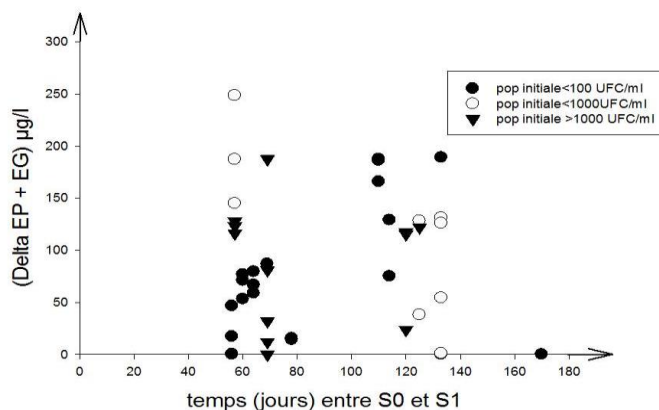


Figure 77 : Variations de la concentration en phénols volatils en fonction de la durée entre les soutirages S0 et S1 et de la population initiale (S0) de *B. bruxellensis*.

Trois barriques présentaient des variations de concentrations en PVs de l'ordre de 10 à 50 µg/L sans être associées à la présence de quantités détectables de populations viables ou cultivables de *B. bruxellensis* dans les échantillons prélevés. Ce résultat peut s'expliquer par (i) un développement de *B. bruxellensis* dans l'intervalle des deux prélèvements, suivis d'une disparition de la population contaminante par mort des levures ou sédimentation dans les lies (non détectée au prélèvement S1, car effectué au-dessus des lies), (ii) la production par des microorganismes autres que *B. bruxellensis* (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Dias *et al.*, 2003b, Martorell *et al.*, 2006 ; de las Rivas *et al.*, 2009 ; Benito *et al.*, 2009b ; Morata *et al.*, 2013). Un état VNC n'est pas envisagé ici, les populations n'ayant pas été détectées par le biais des qPCRs.

4.2 Production de phénols volatils et évolution de la composition en sucres

Nous avons ensuite recherché, par observation visuelle et analyse des données (test de corrélation de Spearman) s'il existait un lien entre la production de PVs observée entre S0 et S1 et :

- × la nature et la concentration des sucres présents au prélèvement S0,
- × la nature et la concentration des sucres libérés entre S0 et S1,
- × la nature et la concentration des sucres disparus entre S0 et S1.

Aucun lien, aucune tendance n'a pu être établie. Il n'existerait donc pas de profil de composition en sucres plus favorable à la formation de phénols volatils, ou du moins, ce seul paramètre ne suffirait pas à prédire le risque.

Nous avons néanmoins poussé les recherches en limitant notre analyse aux sucres privilégiés par *B. bruxellensis* pour sa croissance en milieu modèle et dans le vin (voir Chapitre 2 et 4), à savoir le D-glucose+D-fructose, le D-ribose, le cellobiose, le maltose et le tréhalose. Le tréhalose, issu de l'autolyse des levures après la FA, disparaît dans la majorité des barriques à l'exception d'une barrique (E44, [Figure 75, p197](#)) dans laquelle la concentration augmente pendant cette période. Ce dernier phénomène est possiblement issu de l'autolyse tardive des levures en présence dans le vin (Pellerin et Cabanis, 1998).

La [figure 78](#) présente, pour chaque barrique suivie, les concentrations initiales et finales de sucres consommables et la production de phénols volatils observée entre S0 et S1.

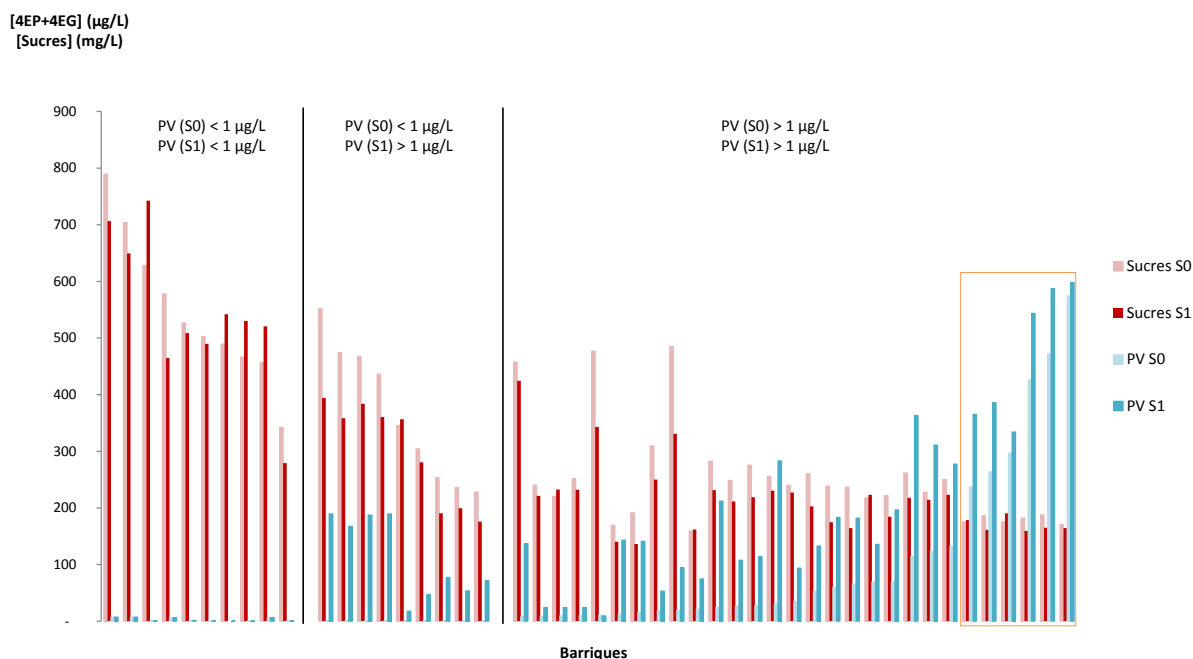


Figure 78: Concentrations en phénols volatils et sucres consommables par *B. bruxellensis* en S0 et en S1 dans les barriques.

Sucres S0 : somme des concentrations dosées dans le prélèvement S0 de glucose+fructose, ribose, galactose, maltose, tréhalose (sucres métabolisables par plus de 75% des *B. bruxellensis* étudiées). *Sucres S1* : somme des concentrations de sucres métabolisables par *B. bruxellensis* au temps S1. L'encadré orange met en évidence les lots pour lesquels une concentration en sucres inférieure à 200mg/L à S0 est associée à la présence de quantités importantes de PV à S0. PV= phénols volatils (4EP+4EG).

Dans la plupart des barriques suivies, la quantité de sucres « métabolisables » par *B. bruxellensis* diminue entre S0 et S1. Mais cette diminution n'est pas corrélée à la production de PVs. Ainsi, dans les échantillons pour lesquels les concentrations initiales de sucres métabolisables étaient inférieures à 200 mg/L (encadré orange, [figure 78](#)), on remarque que

celles-ci varient peu entre les deux stades. Malgré cela, il peut y avoir production de PVs pendant la période étudiée. Inversement, des barriques pour lesquels les sucres métabolisables sont fortement consommés ne voient pas forcément leur concentration en PVs s'élever en proportion. De la même façon, lorsque les sucres qui disparaissent dans les vins sont plutôt des sucres délaissés par *B. bruxellensis* (arabinose, rhamnose), il peut y avoir production de phénols volatils.

Même en restreignant l'étude aux sucres métabolisables par *B. bruxellensis* aux seuls glucose+fructose et/ou tréhalose, il n'apparaît aucun lien entre production de PVs et

- × la nature et la concentration des sucres métabolisables par *B. bruxellensis* présents au prélèvement S0,
- × la nature et la concentration des sucres métabolisables par *B. bruxellensis* disparus entre S0 et S1.

4.3 Résumé des résultats sur élevage

Les analyses menées sur la période d'élevage permettent de dégager quelques tendances : comme sur la période « fermentation », aucun des vins suivis ne contient de mannose ou de raffinose, et chaque vin est différent en ce qui concerne la concentration totale et les proportions relatives de chaque sucre. Glucose+fructose, tréhalose, arabinose et rhamnose sont les sucres les plus abondants. Les traits caractéristiques de château mis en évidence sur la période fermentation persistent au stade élevage, et notamment la concentration totale de sucre ou la richesse en arabinose pour le château A, très singulier. Les phénomènes de libérations de sucres au cours de l'élevage sont très marqués, et gênent la quantification précise des phénomènes de consommations de substrats glucidiques par la microflore présente. Néanmoins, les substrats privilégiés de *B. bruxellensis* (Glucose+fructose, ribose, galactose, maltose, tréhalose et cellobiose) voient leur concentration totale diminuer dans la plupart des cas, que les vins soient clairement contaminés ou pas. Aucun lien n'a pu être établi entre la production de PVs et le profil de sucres présents au départ. Notre idée de faire du dosage des sucres un outil de diagnostic complémentaire du risque « brett » n'a donc pu être développée.

5 Discussion

Ce travail sur les sucres avait pour objectifs (i) d'actualiser les connaissances en termes de composition en oses et disaccharides dans les vins rouges aux stades fermentaires et en élevage et (ii) de déterminer comment leurs concentrations évoluaient pendant la FML et l'élevage. Un panel hétérogène de vins, provenant de domaines viticoles du vignoble bordelais pour deux millésimes, a été suivi pendant la FML, puis pendant la période du 1^{er} été d'élevage en barrique.

L'amélioration de la méthode de dosage de référence nous a permis de confirmer, en une seule analyse, la présence de 13 sucres, précédemment identifiés par plusieurs méthodes complémentaires dans des vins rouges finis : D-glucose-D-fructose, D-galactose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, mannitol, sorbitol, lactose, maltose, cellobiose, mélibiose et tréhalose. Chacun des sucres est présent dans l'ensemble des échantillons et leur somme représente des quantités d'environ 800 mg/L aux deux stades étudiés, le glucose-fructose, le tréhalose, les polyols et les pentoses (arabinose et rhamnose) étant majoritaires (environ 100 mg/L chacun). Les concentrations moyennes obtenues sont dans les gammes décrites dans des vins rouges secs en élevage ou finis (Dubernet, 1974, Pellerin et Cabanis, 1998, Chatonnet, 1995). Contrairement à ce qu'observait Del Alamo *et al.* (2000, dosage par HPLC-PAD) nous n'observons pas de mannose dans nos échantillons, et ce quel que soit le stade de vinification étudié.

Du point de vue des proportions relatives entre les différents sucres, aucune tendance générale ne peut être dégagée. Chaque lot étudié est apparu comme singulier ; le millésime, le cépage et le château influencent fortement la composition globale en sucres observée. Les sucres les plus affectés sont l'arabinose, le mannitol et le sorbitol et le tréhalose. Ainsi la singularité de composition en sucres des vins du château A, quel que soit le stade de vinification étudié (notamment les teneurs en arabinose), pourrait être due à un enrichissement des baies en arabinose ou polysaccharides riches en arabinose et en galactose (PRAGs), du fait du terroir et des pratiques spécifiques de ce domaine. Apolinar-Valiente *et al.* (2013 et 2014b) ont montré que la composition en polysaccharides et oligosaccharides des vins de Mourvèdre (cépage) variait en fonction du domaine viticole. En outre, certaines pratiques de vinification, comme l'enzymage ou les macérations, peuvent augmenter la libération et la dégradation des polysaccharides de la paroi pectocellulosique des baies (Ayestaran *et al.*, 2004 ; Doco *et al.*, 2007 ; Ducasse *et al.*, 2011 ; Apolinar-Valiente *et al.*, 2013, 2014a et b).

Nous observons que les concentrations de sucres provenant du raisin (rhamnose, sorbitol, disaccharides, xylose et arabinose) sont les plus affectées par le paramètre millésime. Ces effets sont néanmoins plus marqués au stade FML qu'au stade élevage. Chaque millésime présente ses particularités en termes de durée d'ensoleillement, de fluctuations de température, d'humidité (brouillards et pluies) et de stress hydrique (quantité d'eau disponible au niveau des racines). En conséquence, le millésime est connu pour influencer de manière importante le métabolisme de la vigne, le développement de la baie de raisin et donc la composition des vins (Geana *et al.*, 2016). Les teneurs en sorbitol des vins varient en fonction du stress hydrique subi par la vigne (Conde *et al.*, 2015), de l'état de la vendange (Triquet-Pissard, 1979) ; il peut aussi être libéré par les levures au cours de la fermentation (Triquet-Pissard, 1979).

La composition des baies et du vin en composés phénoliques ou en polysaccharides sont décrits dans la littérature comme liés au cépage utilisé (Ducasse *et al.*, 2010; Apolinar-Valiente *et al.*, 2014a ; Ferrer-Gallego *et al.*, 2013 ; Geana *et al.*, 2016 ; Heras-Roger *et al.*, 2016). D'après notre étude, seules les concentrations de mannitol semblent elles aussi liées au cépage. Conde *et al.* (2015) ont montré que ce polyol était présent à l'état basal et accumulé dans la pulpe des baies de raisin en réponse au déficit hydrique. Néanmoins, il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée sur les compositions en mannitol des baies de Cabernet-Sauvignon et de Merlot, permettant de confirmer que les différences observées sont liées à un métabolisme spécifique de chaque cépage.

Ce travail suggère donc que la composition en sucres des vins est associée à la notion de terroir, qui implique un lien entre le vin et la zone de production (Barham, 2003). Le sol, le climat ainsi que les pratiques de vinification choisies conduisent à une typicité des vins fonction du lieu où ils sont produits. La composition en sucres de ces vins varie en fonction des châteaux dont ils proviennent (Margaux, Pauillac, Pessac-Léognan, Pomerol et Saint-Emilion). Cette variabilité peut être associée au cépage, au climat, aux pratiques de vinifications ainsi qu'à la flore microbienne en présence pendant les fermentations et à la flore d'altération.

Tout comme le profil global de composition, l'évolution des teneurs en sucres apparaît lot spécifique et il est difficile de dégager des tendances générales. Les variations observées résultent de la superposition de phénomènes de libération et de disparition du fait d'activités chimiques, enzymatiques et microbiennes à l'œuvre dans les différents lots.

Les phénomènes de libération se sont révélés beaucoup plus forts que nous l'avions imaginé au départ. Le L-rhamnose est le principal ose pour lequel un phénomène de libération est observé pendant la FML. Ce pentose est principalement issu de l'hydrolyse des polysaccharides et oligosaccharides pectiques de la baie de raisin par les enzymes du raisin et des préparations commerciales (Apolinar-Valiente *et al.*, 2014a et b). Comme le notait del Alamo (2000), le rhamnose et l'arabinose sont les principaux sucres libérés pendant l'élevage. La libération de l'arabinose dans le vin en barrique est possiblement liée à la diffusion des unités monosaccharidiques présentes dans le bois ainsi qu'à la dégradation des polymères d'hémicellulose du bois ou du raisin (del Alamo *et al.*, 2000, Apolinar-Valiente, 2013, 2014a, b, 2015). Le cellobiose, disaccharide libéré lors de la chauffe du bois des barriques (Blondin *et al.*, 1982) voit également sa concentration augmenter dans certains cas. Del Alamo (2000) a montré que les phénomènes de libération pouvaient varier selon le tonnelier et l'origine géographique du bois de chêne.

A notre connaissance, le rhamnose n'est pas consommé par les bactéries de l'espèce *O. oeni*, principal agent de la FML (Cibrario *et al.*, 2016) et mal par *B. bruxellensis* ; son accumulation

est donc cohérente. Il en va de même pour l'arabinose, ce qui explique que l'on visualise souvent les phénomènes de libération de ces deux sucres. Mais d'autres sucres, plus prisés par la microflore du vin, pourraient aussi être libérés, comme le suggère l'évolution des compositions en sucres des vins entre la FML et le début du 1^{er} été, période d'activité microbienne très réduite : les concentrations relevées en S0 sont globalement plus élevées qu'en fin de FML, notamment pour le glucose+fructose. Ceux-ci pourraient être libérés par diffusion des monosaccharides du bois et par dégradation des polymères d'hémicellulose et de cellulose ou par dégradation des hétérosides (del Alamo, 2000).

Néanmoins, au cours des périodes suivies, FML et 1^{er} été d'élevage, les concentrations des sucres plus « appréciés » par les microorganismes ont plutôt tendance à diminuer, ce qui suggère qu'ils sont consommés. De ce fait et du fait des phénomènes de libération concomitants à la consommation, il est difficile de déterminer les quantités exactes assimilées par les microorganismes. Par ailleurs, les deux périodes suivies sont très différentes en termes de microbiote : pendant la FML, dans les châteaux étudiés, *O. oeni* est largement dominante et ses populations élevées (>10⁶ UFC/mL) sur toute la hauteur des cuves, qu'il s'agisse de souches indigènes ou de souches inoculées. Glucose et fructose sont les principaux sucres qui disparaissent pendant la FML, lorsqu'ils sont suffisamment abondants (plus de 150 mg/L en fin FA). Dans le cas contraire, le tréhalose est le principal sucre à disparaître. Glucose et tréhalose peuvent être consommés par plus de 90% des souches d'*O. oeni* (Cibrario *et al.*, 2016) et le fructose par près de la moitié des souches. Le mannitol peut être produit par la plupart des souches d'*O. oeni* par réduction du fructose (Richter *et al.*, 2003; Cibrario *et al.*, 2016). Néanmoins, sa concentration varie peu en cours de FML dans les vins étudiés, ce qui suggère que le fructose est plutôt utilisé dans les voies centrales. Comme le mannitol, les sucres autres que glucose, fructose et tréhalose sont peu affectés par la FML. La préférence d'*O. oeni* pour les pentoses décrite par Peynaud et Domerg (1970) n'est donc pas observée ici.

Dans les vins en élevage, les niveaux de populations sont beaucoup plus bas que pendant la FML et la diversité microbienne bien plus forte. En outre, en fin de période d'été, avant le soutirage, les populations seraient très hétérogènes dans les barriques. Ceci pourrait expliquer que des tendances soient difficiles à dégager en cours d'élevage. Néanmoins, les sucres métabolisables par *Brettanomyces* ont plutôt tendance à disparaître, indépendamment de sa détection dans les vins. Ceci suggère que ces substrats sont aussi privilégiés par les autres microorganismes présents dans le vin en élevage. Les analyses menées conjointement sur les teneurs en sucre de ces vins n'ont pas permis d'établir des profils ou des quantités de sucre susceptibles de conduire à la production des phénols volatils dans les vins rouges. Néanmoins, des

teneurs élevées en PVs sont généralement associées à des concentrations moins importantes en sucres « consommables » par *B. bruxellensis*.

Notre étude se voulait représentative des vins vinifiés en chais et en conséquence les observations ne peuvent être associées à des paramètres plus précis tels que l'influence des souches de levures ou de bactéries utilisées lors des fermentations. Dans ces conditions et sur la période étudiée (2-3 mois), les variations observées sont trop ténues pour que des liens avec l'altération soient établis et ne permettent à l'heure actuelle pas d'envisager un outil de diagnostic du risque « Brett » basé sur le dosage des sucres. Néanmoins, nos résultats confirment bien que le 1^{er} élevage d'été est une période associée à la formation de phénols volatils comme mentionné par Chatonnet *et al.* (1992).

Cette étude pose aussi la question du mode d'échantillonnage: pour avoir une idée de la composition moyenne des barriques, nous avons choisi de prélever à mi-hauteur. A ce niveau, le vin est représentatif de l'ensemble des composés glucidiques solubles : oses, disaccharides, oligosides et polyosides. Les polysaccharides et les oligosaccharides du vin n'ont pas été dosés dans cette étude, mais de nombreux travaux suggèrent qu'ils ne sédimentent que très peu (Ayestaran *et al.*, 2004). Les phénomènes de libération à partir du bois ou des polysaccharides seraient donc correctement visibles avec ce mode de prélèvement. En revanche, les levures d'altération ont une très nette tendance à sédimenter. Les phénomènes de consommation de sucres et de production de PVs seraient donc très certainement plus intenses au niveau des lies. Cette étude doit donc être complétée par une étude en laboratoire du métabolisme des sucres du vin par *B. bruxellensis* sur des milieux homogènes, en conditions maîtrisées.

Chapitre 4

*Brettanomyces bruxellensis dans les vins rouges :
développement et altération.*

Influence de la température et du groupe génétique.

En lien avec les résultats présentés dans les trois chapitres précédents, nous avons complété certains des travaux par des études réalisées au laboratoire, dans du vin dans le chapitre suivant.

1 Influence de la température sur le développement de *B. bruxellensis* dans les vins rouges

Les discussions avec de nombreux vinificateurs ainsi que les observations décrites dans la partie précédente ont révélé que la détection de populations élevées de *Brettanomyces bruxellensis* et la production de phénols volatils sont des phénomènes récurrents lors du premier été de l'élevage en barrique. Ce phénomène est également rapporté par Chatonnet (1992). C'est également à ce moment de l'année que la température dans les chais est potentiellement la plus élevée.

Une étude de Barbaresi (2015) a en effet montré que, dans un chai, la température peut varier entre 12 et 25°C et qu'elle augmente de manière constante entre Janvier et Juillet. Le soutirage est une technique couramment utilisée pour limiter la population en microorganismes dans le vin en élevage. Habituellement, les soutirages encadrant la période du premier été d'élevage ont lieu en juin et en août ou septembre. Pendant cette période de 2 à 3 mois en moyenne, le vin en élevage et son microbiote sont soumis aux variations de température. L'amplitude de ces variations et leur impact sur l'activité de *B. bruxellensis* dans les vins d'élevage a peu été étudiée.

Plusieurs études se sont néanmoins intéressées à l'impact de la température sur la croissance de *B. bruxellensis* et sur la production de phénols volatils (PVs) en milieu modèle et dans le vin. Si la température optimale de croissance de *B. bruxellensis* se situe entre 25°C et 28°C, plusieurs recherches ont montré que la croissance et la production de phénols volatils dans le vin étaient possibles dès 15°C (Barata *et al.*, 2008b; Zuehlke et Edwards, 2013) et pouvaient permettre l'accumulation de quantités supérieures à la limite de perception couramment admise de 426 µg/L en 4EP+4EG dans le vin (Chatonnet *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'impact de la température sur la croissance serait souche-dépendant et certaines souches seraient capables de survivre et de maintenir leur population à 10°C dans le vin (Zuehlke et Edwards, 2013) comme en milieu modèle (Conterno *et al.*, 2006). Un lien entre production de phénols volatils et croissance (vitesse et biomasse accumulée) a été établi en milieu modèle, mais, malgré quelques études, il n'a pas été clairement défini dans le vin (Barata *et al.* 2008b). En l'absence de croissance, il n'y aurait pas production de phénols volatils (Barata *et al.*, 2008b; Coulon *et al.*, 2009). Par ailleurs, Romano (2008) suggère qu'un niveau de population de 10⁵ à 10⁶ cell/mL doit être atteint dans le vin pour

qu'il y ait production de phénols volatils mais ce phénomène n'est pas retrouvé par Barata (2008b). Dias (2003a) montre que, lorsqu'elle est inoculée en présence de *S. cerevisiae* en début de fermentation alcoolique à 10 UFC/mL ou 10⁴ UFC/mL, *B. bruxellensis* atteint dans les deux cas des populations de l'ordre de 10⁸ UFC/mL en fin de FA. Elle produit ensuite des concentrations équivalentes en phénols volatils (pour les deux niveaux de population d'inoculation) lors de la période de post-fermentation. A notre connaissance, il s'agit de la seule étude sur l'impact du niveau de population sur la production de phénols volatils et aucun projet n'a étudié cet impact pendant l'élevage.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'impact de la température, dans des gammes observées aux chais sur la croissance de *B. bruxellensis* et sur la production de phénols volatils dans des conditions mimant l'élevage entre deux soutirages (nature des vins, niveaux de populations, durée de l'expérience).

L'étude a été menée en deux temps :

- dans un premier temps, les températures ont été mesurées dans les chais d'élevage. Cela a permis de déterminer précisément les gammes de températures et les variations auxquelles sont soumis les vins pendant l'élevage dans les chais et notamment pendant l'été.
- A partir de ces données, une expérience mesurant l'impact de la température sur l'évolution de la population de *B. bruxellensis* et des concentrations de phénols volatils a été réalisée au laboratoire.

1.1 Mesure des températures dans les chais d'élevage

Dans le cadre d'une collaboration avec plusieurs châteaux du vignoble bordelais, nous avons relevé les températures de plusieurs chais au cours de l'année 2016. Dans la [figure 79](#) (p suivante) sont représentées les variations de température mesurées entre le 31 Mai 2016 et le 1er Novembre 2016 pour les châteaux A, D et F. Pendant cette période critique pour le développement de *Brettanomyces bruxellensis*, les températures augmentent dans tous les chais étudiés pour atteindre des températures comprises entre 15 et 20°C. Les brusques diminutions de températures sur des périodes d'une à deux semaines (dans le château F par exemple) sont dues à des opérations de vinification menées temporairement au chai. Après le mois de septembre, les températures dans les châteaux A et D ont rapidement diminué de 2 à 5°C pour atteindre 13 à 14°C au mois de novembre.

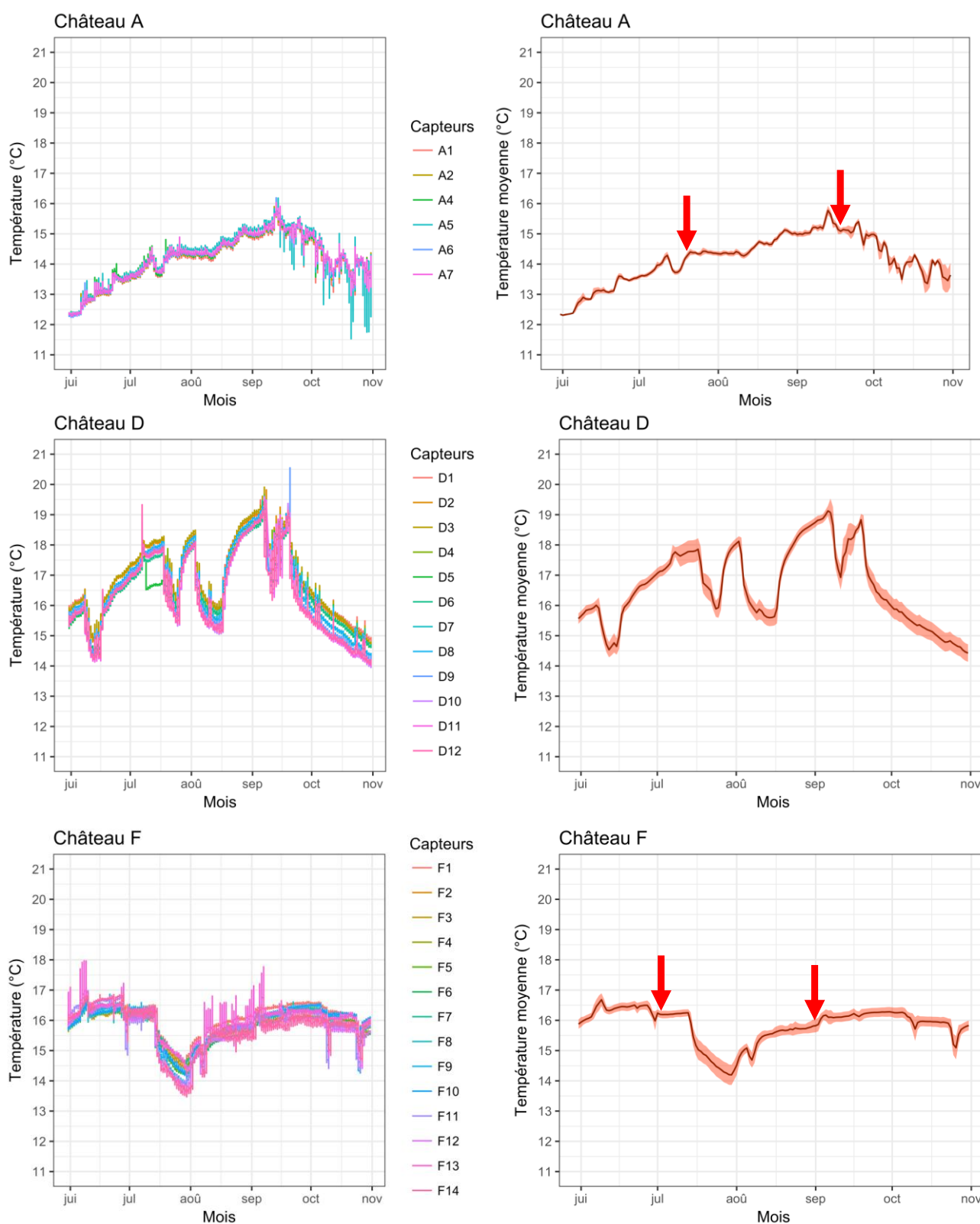


Figure 79 : Variations des températures dans les chais A; D et F.

A gauche, sont représentées les données collectées par tous les capteurs. *A droite*, sont représentés la moyenne et les écart-types en orange. Les flèches rouges indiquent les dates des soutirages.

De manière globale, la température dans les chais étudiés varie donc entre 12 et 20°C, ce qui est en accord avec les travaux de Barbaresi (2015). L'été, la température dans les chais est effectivement plus élevée que le reste de l'année, de 3 à 5°C en moyenne. Néanmoins, les gammes de température dans les chais sont différentes entre les châteaux. Ainsi, dans le château A, la température moyenne est de 13,77°C et ne dépasse pas 15°C alors qu'elle est de 16,69°C dans le château D pour un maximum de 19,51°C (Tableau 30).

Tableau 30: Bilan des températures relevées par les capteurs dans les chais sur la période été, dans 3 châteaux.

	Château A	Château D	Château F
Période	Début Juin – Début Septembre	Début Juin – Début Septembre	Début Juin – Début Septembre
Tmin	12,25°C	14,14°C	14,03°C
Tmoy	13,77°C	16,69°C	15,56°C
Tmax	15,01°C	19,51°C	16,89°C
Delta	2,75°C	5,38°C	2,86°C

1.2 Impact de la température sur le développement de *B. bruxellensis* dans le vin au laboratoire : suivi mensuel

L'impact de la température sur la croissance et sur la production de phénols volatils a été étudié sur les souches L0424 et L0611 à 12, 14, 16, 18 et 20°C, dans un vin prélevé en début d'élevage.

L'objectif était d'observer les évènements sur une durée équivalente à celle qui s'écoule entre deux soutirages. La durée moyenne entre les deux soutirages d'été, calculée sur les 8 châteaux suivis pour les millésimes 2015 et 2016 est de 91 jours. Nous avons donc choisi de travailler sur une durée de 3 mois.

Les cultures ont étéensemencées à 10² UFC/mL pour chaque souche (Tableau 31), puis les tubes ont été incubés aux 5 températures cibles. Les populations cultivables étaient systématiquement inférieures d'un log aux résultats qPCR pour la souche L0424 et de 2 log pour la souche L0611. Cet écart est lié à la détection des populations viables non cultivables et de l'ADN résiduel des cellules mortes par qPCR. L'écart plus important observé pour les cultures inoculées avec la souche L0611, suggère que celle-ci se trouve dès le départ dans un état physiologique moins actif que la souche L0424. Il semble donc qu'il existe dès le départ une différence entre les deux souches en termes d'adaptation au milieu vin, phénomène déjà observé à plusieurs reprises avec d'autres souches diploïdes difficiles à maintenir dans le vin.

Le suivi mensuel des populations de levures confirme cette hypothèse : la souche L0424 se multiplie alors que la souche L0611 peine à se maintenir ou même à survivre aux plus basses températures (Figure 80).

Tableau 31 : Populations à T0 dans les cultures déterminées par qPCR (en cellules/mL) et par dénombrement sur boîte (en UFC/mL) et inoculées à 10^2 UFC/mL.

	Population théorique	10^2 UFC/mL	
		Cell/mL	UFC/mL
L0424-1	$2,8 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^2$	
L0424-2	$2,9 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^2$	
L0611-1	$1 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^2$	
L0611-2	$7,9 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^2$	

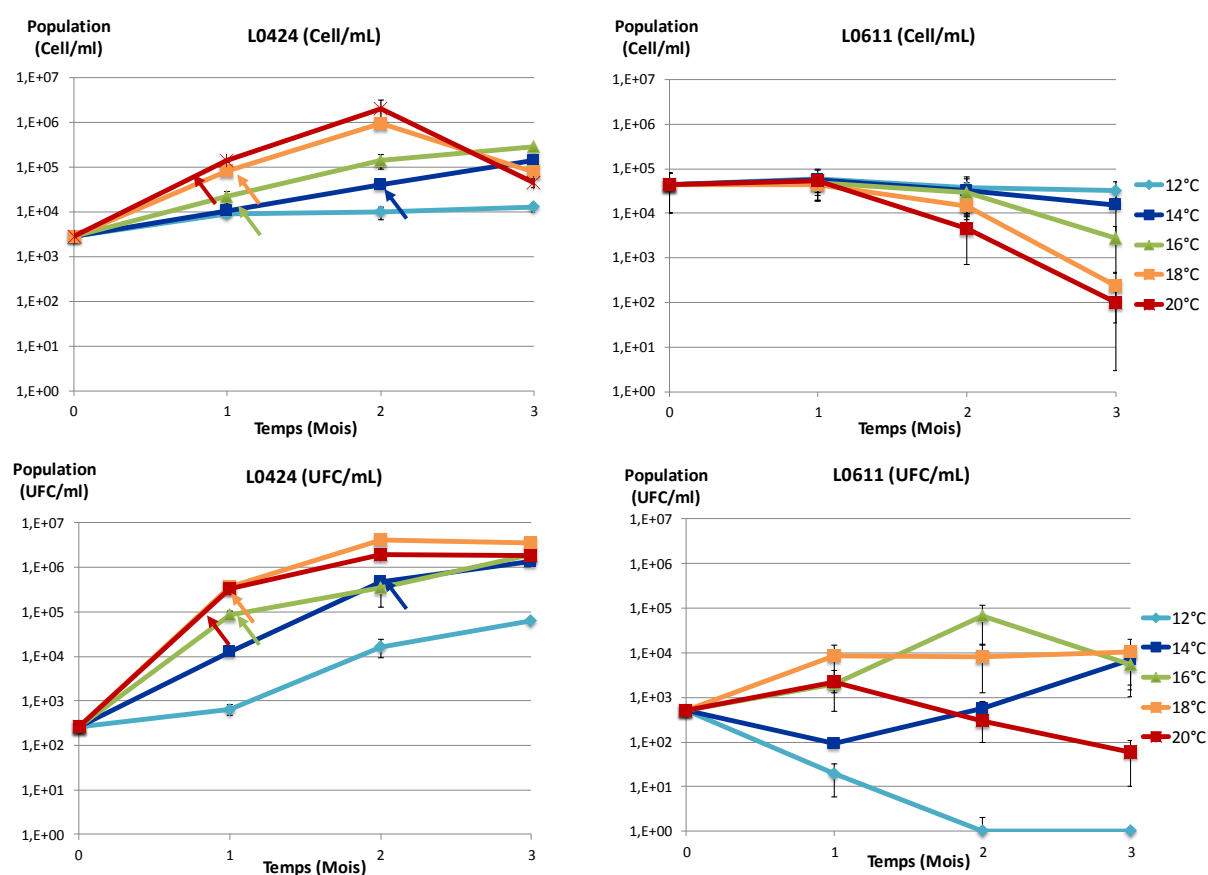


Figure 80 : Evolution de la population de la souche L0424 en cell/mL et en UFC/mL et de la souche L0611, inoculées à 10^2 UFC/mL, à 12, 14, 16, 18 et 20°C sur trois mois.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats de chaque souche. Ils ont été reliés afin de permettre une meilleure lecture de l'évolution de la population. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreur. Les flèches sur les figures A et C indiquent le début de la production de phénols volatils.

La croissance de la souche L0424 a été possible à toutes les températures. Dès le premier mois, les populations cultivables sont équivalentes aux populations totales entre 14°C et 20°C (Figure 80C). Ceci est observé dès le 2^{ème} mois à 12°C. Ainsi, cette souche s'est adaptée au milieu vin, dès le premier mois, et y a trouvé des conditions permettant son développement.

- La vitesse de croissance augmente avec la température.
- Néanmoins, entre 14 et 20°C, la température n'a pas d'influence sur la quantité de biomasse produite après 3 mois qui se situe aux alentours de 10⁶ UFC/mL à 90 jours (Figure 80 et Tableau 32). Ceci suggère que c'est le milieu qui fixe la population totale (limitation, inhibition). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dias (2003a) en milieu modèle, de Brandam (2007) et Barata (2008b) dans le vin.
- D'autre part, comme on le voit sur la figure 80C (flèches), la production de phénols volatils débute lorsque la population atteint 10⁵ UFC/mL (boîtes) et entre 10⁴ et 10⁵ cell/mL (qPCR) d'après la figure 80A (flèches).
- A 12°C, la croissance plus lente explique la plus faible quantité de biomasse produite en 3 mois (Tableau 32) : la biomasse maximale n'est pas atteinte sur la durée de l'expérience ; elle n'atteint pas 10⁵ UFC/mL et il n'y a pas de production de phénols volatils.
- La diminution finale des populations en cell/mL observée à 18 et 20°C pourrait être due à une inhibition de la PCR.

Tableau 32 : Moyennes des populations initiales et finales pour la souche L0424.

Entre parenthèse sont mentionnés les écart-types.

	Population initiale		Population finale	
	Cell/mL	UFC/mL	Cell/mL	UFC/mL
12°C			1,3*10 ⁴ (3,1*10 ³)	6,35*10 ⁴ (3,5*10 ³)
14°C			1,4*10 ⁵ (4,0*10 ⁴)	1,39*10 ⁶ (7,5*10 ³)
16°C	2,85*10 ³ (+/- 50)	2,6*10 ² (+/- 70)	2,85*10 ⁵ (1,5*10 ⁴)	1,97*10 ⁶ (2,8*10 ⁵)
18°C			7,6*10 ⁴ (1,1*10 ⁴)	3,6*10 ⁶ (3,4*10 ⁵)
20°C			4,45*10 ⁴ (9,5*10 ³)	1,87*10 ⁶ (4,9*10 ⁵)

L'expérience et les prélèvements n'ont pas permis de voir une augmentation de la population totale de la souche L0611 quelle que soit la température étudiée (Figure 80B). La croissance de cette souche semble inhibée dans le vin étudié, peut-être à cause de la concentration élevée en éthanol de 14% (v/v). Ce phénomène semble modulé par les basses températures. En effet, alors que la population totale diminue dès le 2^{ème} mois dans les cultures incubées de 14°C à 20°C, à 12°C, elle reste constante sur 90 jours. A l'inverse, la population cultivable à 12°C est <1

UFC/mL dès le 2^{ème} mois. Chez cette souche, les températures basses pourraient favoriser l'entrée et le maintien des populations au stade VNC.

Entre 14 et 20°C, les populations totales diminuent et les populations cultivables fluctuent, mais n'atteignent jamais 10⁵ UFC/mL. Les populations en fin d'expérience sont toutes inférieures à cette valeur (Tableau 33). Il n'y a pas de production d'éthyl phénol sur les 3 mois de l'expérience avec cette souche.

Tableau 33 : Moyennes des populations initiales et finales pour la souche L0611.
Entre parenthèse sont mentionnés les écart-types.

Population initiale		Population à 3 mois		
Cell/mL	UFC/mL	Cell/mL	UFC/mL	
12°C		3,25*10 ⁴ (+/- 1,75*10 ⁴)	1	
14°C		1,55*10 ⁴ (+/- 1,24*10 ⁴)	7,09*10 ³ (+/- 5,22*10 ³)	
16°C	4,45*10 ⁴ (+/- 3,45*10 ⁴)	5,05*10 ² (+/-1,05*10 ²)	2,77*10 ³ (+/- 2,32*10 ³)	5,5*10 ³ (+/- 4,0*10 ³)
18°C		2,37*10 ² (+/- 2,34*10 ²)	1,04*10 ⁴ (+/-9,42*10 ³)	
20°C		1,02*10 ² (+/- 68)	60 (+/- 50)	

1.3 Cinétiques de production de phénols volatils : suivi mensuel

Les cinétiques de production de phénols volatils sont détaillées sur la [figure 81](#). Comme mentionné plus haut, il n'y a pas de production de phénols volatils dans les vins inoculés avec la souche L0611. Seuls les résultats obtenus avec la souche L0424 seront donc commentés ici. Les résultats de dosage des phénols volatils sont présentés sous la forme de la somme des concentrations en 4EP et 4EG mesurées par SPME-GC-MS, en µg/L.

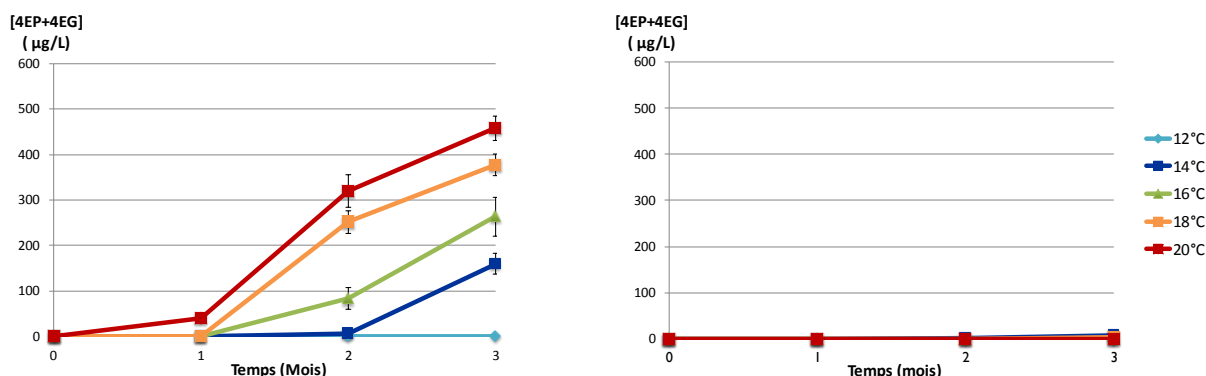


Figure 81 : Concentrations moyennes de phénols volatils à 1, 2 et 3 mois, à 12, 14, 16, 18 et 20°C, par la souche L0424 à gauche et par la souche L0611, à droite.

Les points représentent les moyennes en (EP + EG) produits par les deux réplicats de chaque souche. Ils ont été reliés afin de permettre une meilleure lecture de l'évolution des concentrations en phénols volatils. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreurs.

La souche L0424 a produit des phénols volatils à partir des acides hydroxycinnamiques contenus dans le vin à toutes les températures d'incubation, excepté à 12°C. Le seuil de rejet du 4EP+4EG de 426 µg/L défini par Chatonnet (1992) est atteint après trois mois d'incubation à 20°C.

La quantité moyenne produite après 3 mois d'expérience augmente avec la température d'incubation. Elle est de 159 µg/L à 14°C et de 458,9 µg/L à 20°C. Cette augmentation n'est pas liée à la quantité de biomasse obtenue à trois mois (qui reste constante). La [figure 81](#) suggère plutôt que l'augmentation est liée à la durée de production effective qui augmente avec la température ; autrement dit, la date à laquelle débute l'accumulation visible d'éthyls phénols, compte tenu des limites de la méthode analytique, est d'autant plus précoce que la température d'incubation est élevée. Comme vu au paragraphe précédent, le début de la production concorde avec une population de 10⁵ UFC/mL qui est atteinte plus rapidement avec l'augmentation de la température. La quantité de biomasse insuffisante pourrait donc expliquer l'absence de production à 12°C malgré une augmentation de la population active et une augmentation d'environ 1 log de la population totale à 10⁴ cell/mL ([Tableau 33](#)).

Cette première série de résultats amène aux conclusions pratiques suivantes : lorsque la population initiale, en début de soutirage, est de 10² UFC/mL, les risques d'apparition d'éthyl phénols sont réels. Ces risques sont d'autant plus grands que la souche présente est adaptée au vin. La comparaison des populations cell/mL et UFC/mL pourrait donner une idée de ce niveau d'adaptation, même si ceci est plus difficile à interpréter dans un contexte de vin en élevage présentant des mélanges de souches. Par ailleurs, la présence de souches apparentées au groupe triploïde vin (décelable par PCR TYPEBRETT) pourrait constituer un facteur de risque accru : en effet, même si nous n'avons analysé ici que deux souches, la mise en culture de *B. bruxellensis* dans le vin est toujours plus facile au laboratoire avec les souches triploïdes. Dans le cas de souches adaptées, la maîtrise des températures est un élément essentiel et le seuil de 14°C ne devrait pas être dépassé. Ce niveau de température étant certainement très difficile à maintenir même en chais enterrés, nous allons voir s'il est possible de limiter les risques en abaissant la population initiale de levures cultivables.

1.4 Effet du taux d'inoculation et de la température sur la croissance

Une expérience similaire à celle décrite aux paragraphes 1.2 et 1.3 a été réalisée avec le même vin et les souches L0424 et L0611 ont été inoculées à 10, 10² et 10³ UFC/mL, à 14 et 18°C. La population et la concentration en phénols volatils ont été suivies sur trois mois, par prélèvement mensuel.

Comme pour l'expérience précédente, l'analyse des populations initiales par qPCR en cell/mL et par dénombrement sur boîte en UFC/mL témoigne d'une différence d'état physiologique entre les deux souches (Tableau 33). Les populations dénombrées sur boîte sont systématiquement inférieures d'un log aux résultats qPCR pour la souche triploïde L0424 et de 2 log pour la souche diploïde L0611.

Tableau 33 : Populations initiales (T0) totales (cell/mL) et cultivables (UFC/mL)

Population en UFC/mL théorique	10 UFC/mL		10 ² UFC/mL		10 ³ UFC/mL	
	Cell/mL	UFC/mL	Cell/mL	UFC/mL	Cell/mL	UFC/mL
L0424-1	5,5*10 ²	<1	2,8*10 ³	3,3*10 ²	2,5*10 ⁴	9,4*10 ²
L0424-2	7,1*10 ²	19	2,9*10 ³	1,9*10 ²	2,4*10 ⁴	2,85*10 ³
L0611-1	3,3*10 ³	40	1*10 ⁴	6,1*10 ²	1,2*10 ⁵	4,87*10 ³
L0611-2	1,2*10 ⁴	23	7,9*10 ⁴	4*10 ²	7,9*10 ⁵	1,63*10 ³

1.4.1 Effets du taux d'inoculation et de la température sur la croissance

Nous allons d'abord nous intéresser à la souche L0424. Comme indiqué sur la figure 82, la croissance a eu lieu aux trois taux d'inoculation à 14°C et à 18°C. Pour chaque taux d'inoculation, les vitesses de croissance ont augmenté avec la température. Néanmoins, après trois mois, des quantités de biomasse équivalentes d'environ 10⁶ UFC/mL ont été obtenues dans les deux conditions pour les trois taux d'inoculation, suggérant, comme lors de l'expérience précédente, l'existence d'une concentration cellulaire plafond, impossible à dépasser du fait d'une limitation ou d'une inhibition dans le vin étudié. Un résultat similaire avait été obtenu par Dias (2003b) dans des moûts de blanc et de rouge en fermentation alcoolique. Comme observé précédemment, la production de phénols volatils a débuté pour des populations supérieures à 10⁵ UFC/mL, quelle que soit la condition considérée. La lecture de la courbe en cell/mL ne donne aucun renseignement de ce type.

Par ailleurs, comme lors de l'expérience précédente, les populations finales en cell/mL diminuent à 18°C de façon inexplicable sinon une inhibition de la PCR (échantillon trop chargé).

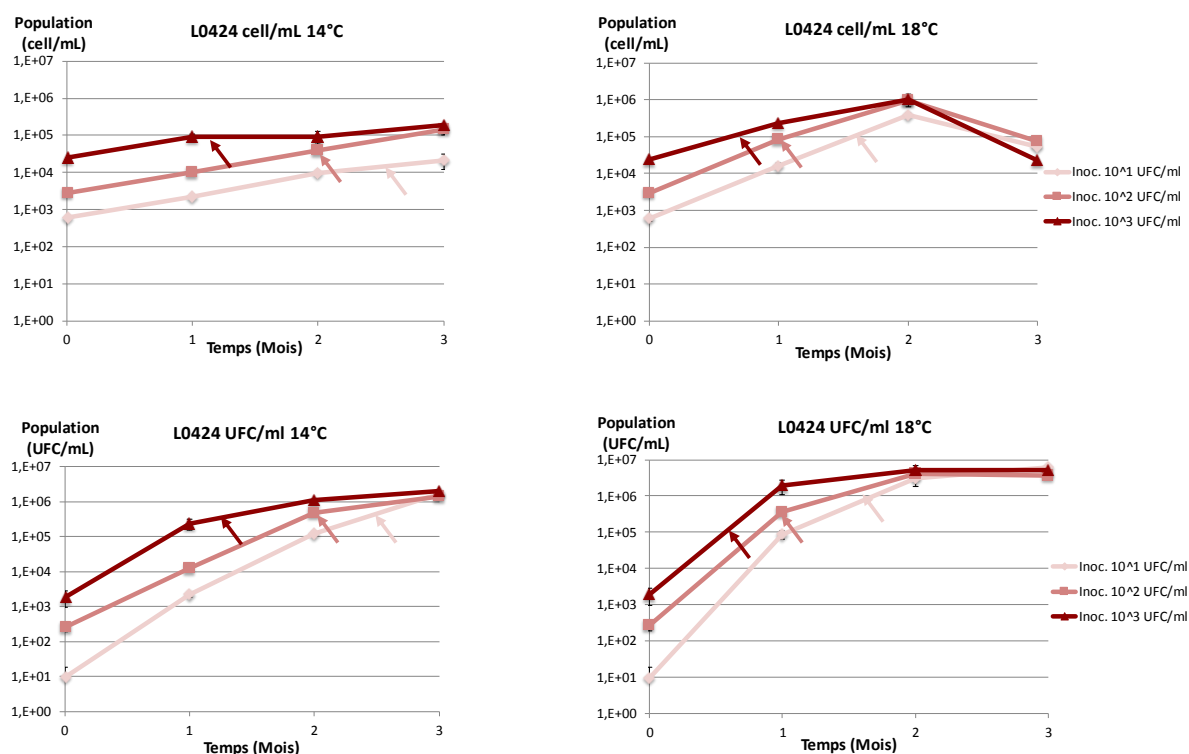


Figure 82 : Evolution de la population totale (cell/mL) et cultivable (UFC/mL) de L0424 à 14°C et 18°C, pendant trois mois en fonction du taux d'inoculation de 10¹, 10² et 10³ UFC/mL.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats de chaque souche. Ils ont été reliés afin de permettre une meilleure lecture de l'évolution de la population. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreur. Les flèches indiquent, pour chaque taux d'inoculation, le début de la production de phénols volatils.

Avec la souche L0611, à 14°C et à 18°C, la population totale se maintient le premier mois, puis décline, et ce déclin est plus important à 18°C qu'à 14°C (Figure 83). A l'inverse, la population cultivable augmente. La part de population active dans la population totale augmente donc ce qui traduit peut-être une amélioration de l'état physiologique des cellules présentes aux deux températures au cours du temps. Seule la cultureensemencée à 10 UFC/mL, à 14°C, évolue très peu. Pour les taux d'inoculation 10² et 10³ UFC/mL, les populations cultivables augmentent de 1 log minimum (à 14 et 18°C) et atteignent des niveaux équivalents à trois mois aux deux températures.

Cette augmentation de population cultivable n'est pas systématiquement associée à une production de phénols volatils. En effet, celle-ci n'est perceptible avec les méthodes de dosage employées, que pour les taux d'inoculation les plus forts. Les cultures inoculées à 10² UFC/mL, malgré une augmentation de biomasse jusqu'à 10⁴ UFC/mL n'ont pas produit de phénols volatils. A l'inverse, les cultures inoculées à 10³ UFC/mL et dont la population a dépassé les 10⁴-10⁵

UFC/mL ou cell/mL (Figure 83), ont produit des phénols volatils. Il semble donc que ce soit la quantité de biomasse active qui importe dans le déclenchement de la production. Les résultats de qPCR renseignent peu ici sur le potentiel de production.

L'augmentation de la température, en accélérant la croissance, permet le déclenchement plus précoce de la production : les cultures à 18°C ont produit dès le 1^{er} mois et celles à 14°C dès le 2^{ème} mois.

Globalement, le seuil de population à partir duquel la production est observée semble légèrement plus bas chez cette souche que chez l'autre. Nous allons étudier ce point plus en détail.

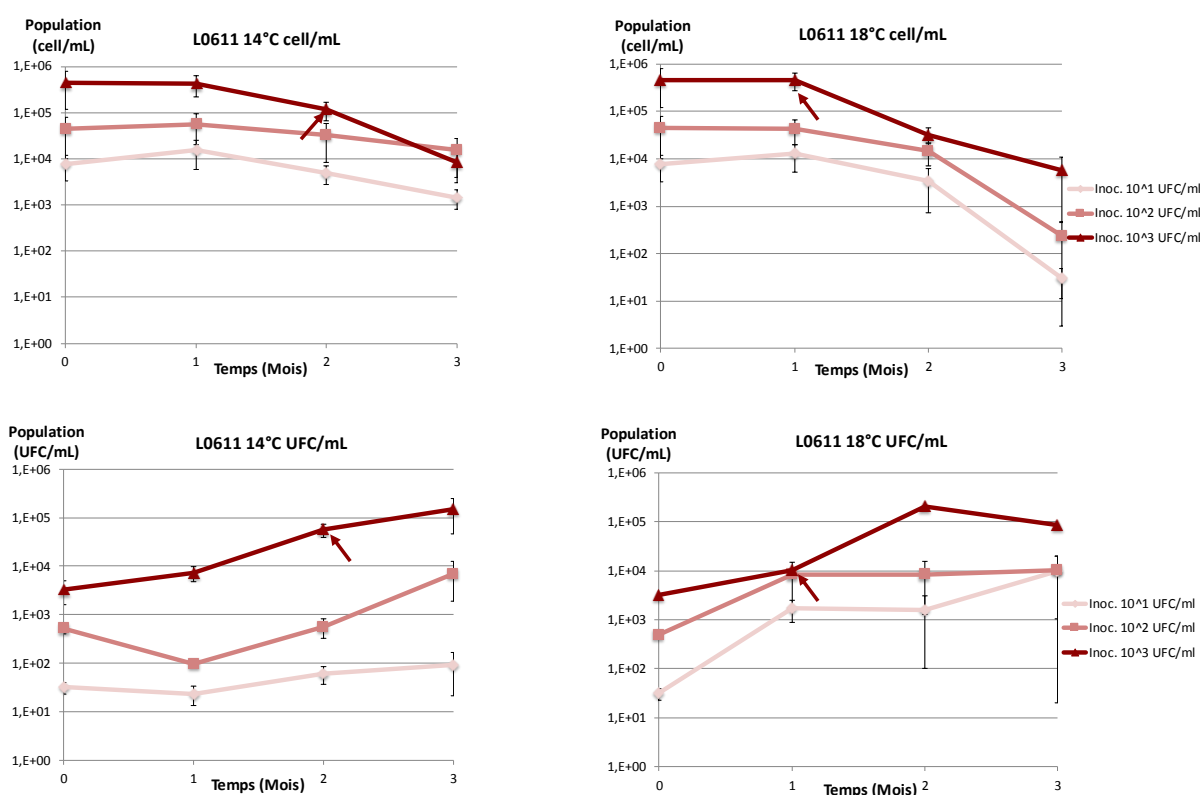


Figure 83 : Evolution de la population totale (cell/mL) et cultivable (UFC/mL) de L0611 à 14°C et 18°C, pendant trois mois en fonction du taux d'inoculation de 10¹, 10² et 10³ UFC/mL.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats de chaque souche. Ils ont été reliés afin de permettre une meilleure lecture de l'évolution de la population. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreur. Les flèches indiquent, pour chaque taux d'inoculation, le début de la production de phénols volatils.

1.4.2 Effet du taux d'inoculation et de la température sur la cinétique de production

La souche L0611 a produit des phénols volatils pour un taux d'inoculation de 10^3 UFC/mL. Cette production est différente entre les deux réplicats et pour les deux conditions. Le réplicat 1 produit 106 et 273 $\mu\text{g/L}$ à 14°C et 18°C respectivement, et le réplicat 2 produit 85 $\mu\text{g/L}$ à 18°C et ne produit pas à 14°C (Figure 84). Comme suggéré au paragraphe précédent, l'analyse plus précise de la cinétique de production à 18°C montre qu'avec cette souche, la production débute lorsque la population active atteint environ 10^4 UFC/mL. Un phénomène similaire est observé dans le réplica 1 à 14°C . A 14°C dans le réplicat 2, la population augmente d'un log puis se maintient à 10^4 UFC/mL, et ceci ne s'accompagne pas de production de phénols volatils.

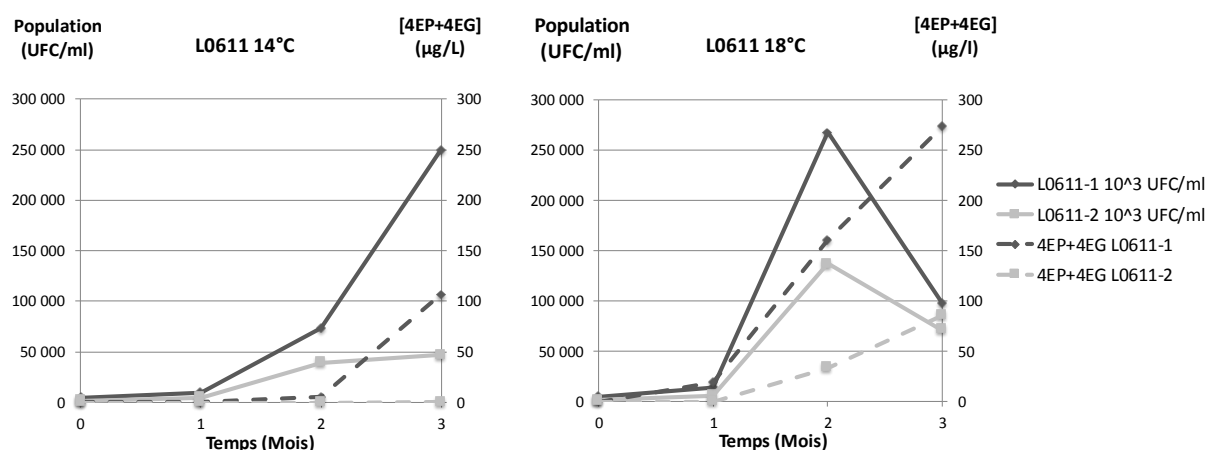


Figure 84 : Populations cultivables (traits pleins) et phénols volatils produits (traits pointillés) pour chaque réplica (1 : gris foncé ; 2 : gris clair) de la souche L0611 pour les cultures incubées à 14°C (A) et à 18°C (B) et inoculées à 10^3 UFC/mL.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats de chaque souche. Ils ont été reliés afin de permettre une meilleure lecture de l'évolution de la population et des phénols volatils. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreur.

La différence entre les deux réplicats s'explique probablement par une différence d'état physiologique des deux inocula dans les précultures. Nos résultats confirment donc que, dans le vin, c'est la population active qui est responsable de la production de phénols volatils (Chandra *et al.* 2015). Il semblerait qu'un seuil de population de 10^4 UFC/mL soit nécessaire avec la souche L0611, mais pas suffisant : il faut également que la population cultivable continue d'augmenter.

La température a eu un effet sur la vitesse de croissance et donc sur la précocité de la production qui, par voie de conséquence, module la quantité de phénols volatils produits en fin de période de 3 mois (Barata *et al.*, 2008b).

A 14°C et à 18°C, toutes les cultures inoculées par L0424 ont produit des phénols volatils, quel que soit le taux d'inoculation (Figure 85 et Figure 86, page suivante). Pour cette souche également, plus le taux d'inoculation et la température sont élevés, plus le début de la phase de production est précoce, même si le seuil de population efficace est légèrement plus élevé (10^5 UFC/mL).

En conséquence, la quantité en phénols volatils produits en 3 mois augmente avec le taux d'inoculation et la température (Figure 85 et Figure 86, page suivante). Les écarts obtenus pour les différents taux d'inoculation sont moins importants à 18 qu'à 14°C. Ces graphiques montrent que dans nos conditions, en abaissant et en maintenant la température à un seuil inférieur ou égal à 14°C, on peut maintenir le niveau de production sur une période de trois mois en dessous du seuil de perception, quelle que soit la population initiale $\leq 10^3$ UFC/mL), mais les altérations seront d'autant moins importants que la population initiale est basse. A 18°C, le seuil de rejet ($426\mu\text{g/L}$) est atteint entre 2 et 3 mois avec une population initiale de 10^3 UFC/mL et seulement approché au bout de 3 mois pour les autres populations initiales étudiées. La population présente en début de soutirage doit donc également être prise en compte dans la gestion des vinifications.

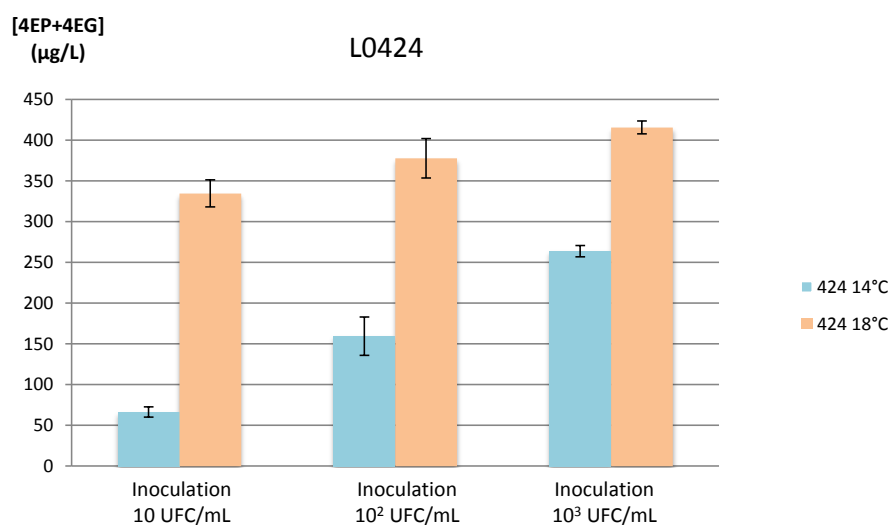


Figure 85 : Quantité de phénols volatils produits dans des cultures inoculées par L0424 à 10, 10^2 et 10^3 UFC/mL après trois mois d'incubation à 14°C (Bleu) et 18°C (Orange).

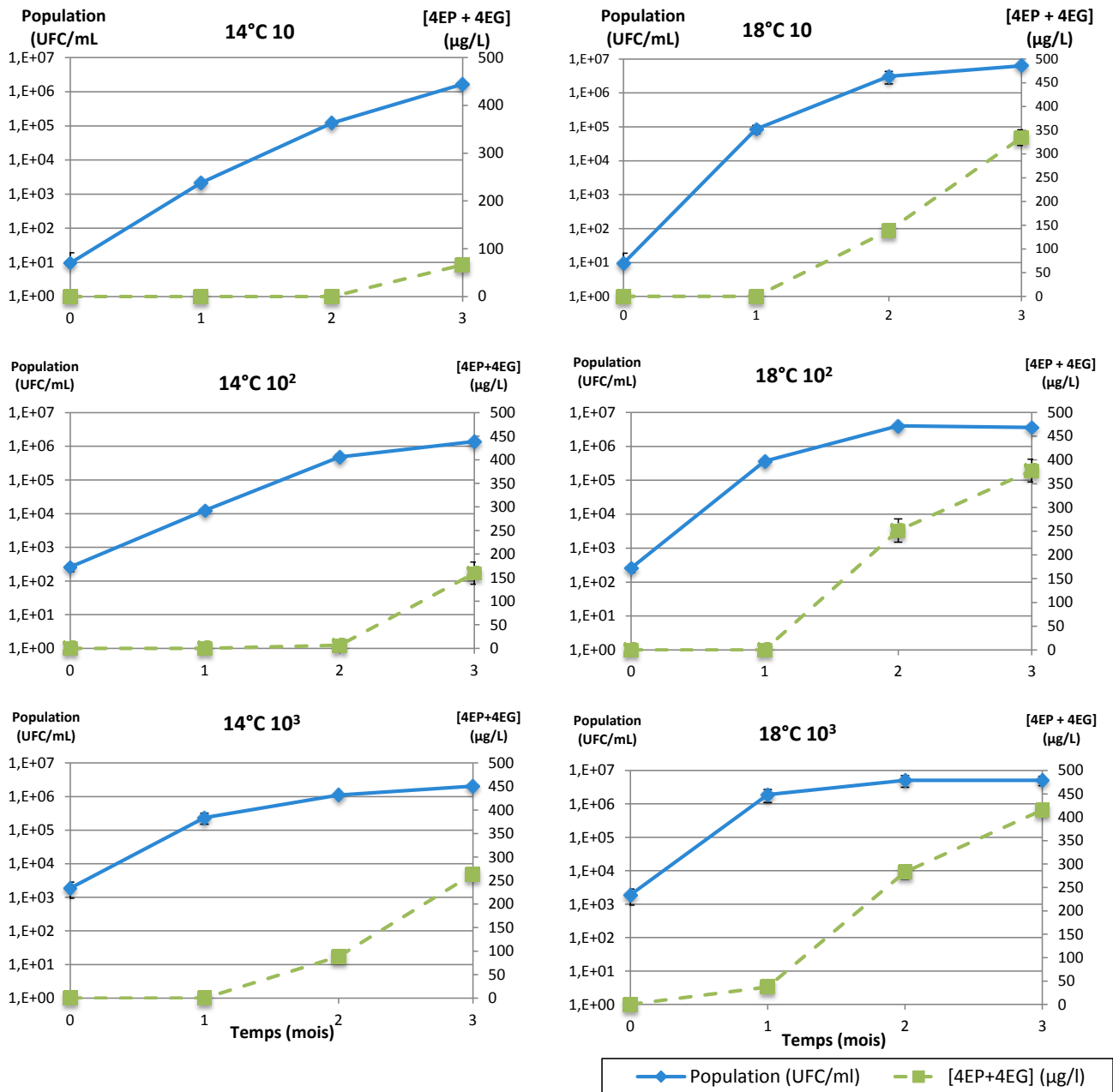


Figure 86 : Populations cultivables (traits pleins) et phénols volatils produits (traits pointillés) de la souche L0611 pour les cultures incubées à 14°C et à 18°C et inoculées à 10, 10² et 10³ UFC/mL.

Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreurs. Les points ont été reliés pour faciliter la lecture.

1.5 Etude physiologique avec un suivi hebdomadaire

Une étude détaillée des expériences menées avec les deux souches, à un taux d'inoculation de 10^2 UFC/mL a été réalisée aux températures de 14 et 18°C. Les résultats sont présentés sur la [figure 87](#).

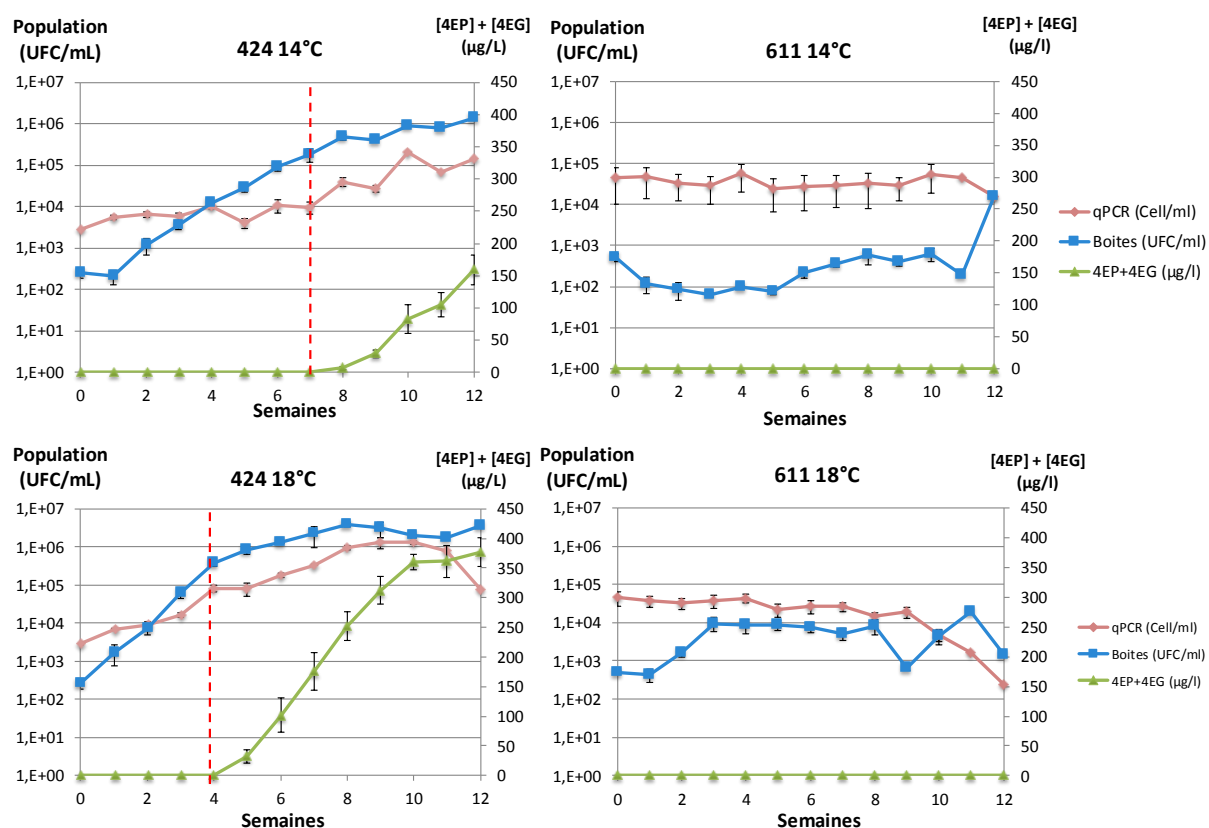


Figure 87 : Evolution de la population en cell/mL (rouge) et UFC/mL (bleu) ainsi que de la concentration en phénols volatils (vert) à 14°C et 18°C sur 12 semaines pour la souche L0424 et pour la souche L0611.

Les traits rouges en pointillé sur les figures A et C marquent le début de la production de phénols volatils. Les écarts à la moyenne sont représentés par des barres d'erreurs. Les points ont été reliés pour faciliter la lecture.

Le suivi hebdomadaire confirme l'absence de croissance et de production concernant la souche L0611.

Le suivi hebdomadaire des populations de L0424 et de la concentration en phénols volatils à 14 et 18°C permet d'étudier plus finement les paramètres de croissance et de production de cette souche. L'ajustement des points expérimentaux de cultivabilité au modèle logistique a permis de déterminer avec plus de précision les différentes phases de croissance de la souche

dans les deux conditions (Figure 88). Les points ajustés ont été utilisés pour calculer les taux de croissance et de consommation en sucres et de production de phénols instantanés.

D'après les figures A et B, l'évolution de la population cultivable dans les conditions étudiées est correctement décrite par le modèle de croissance logistique ($R^2 > 0,98$ à 14 et 18°C).

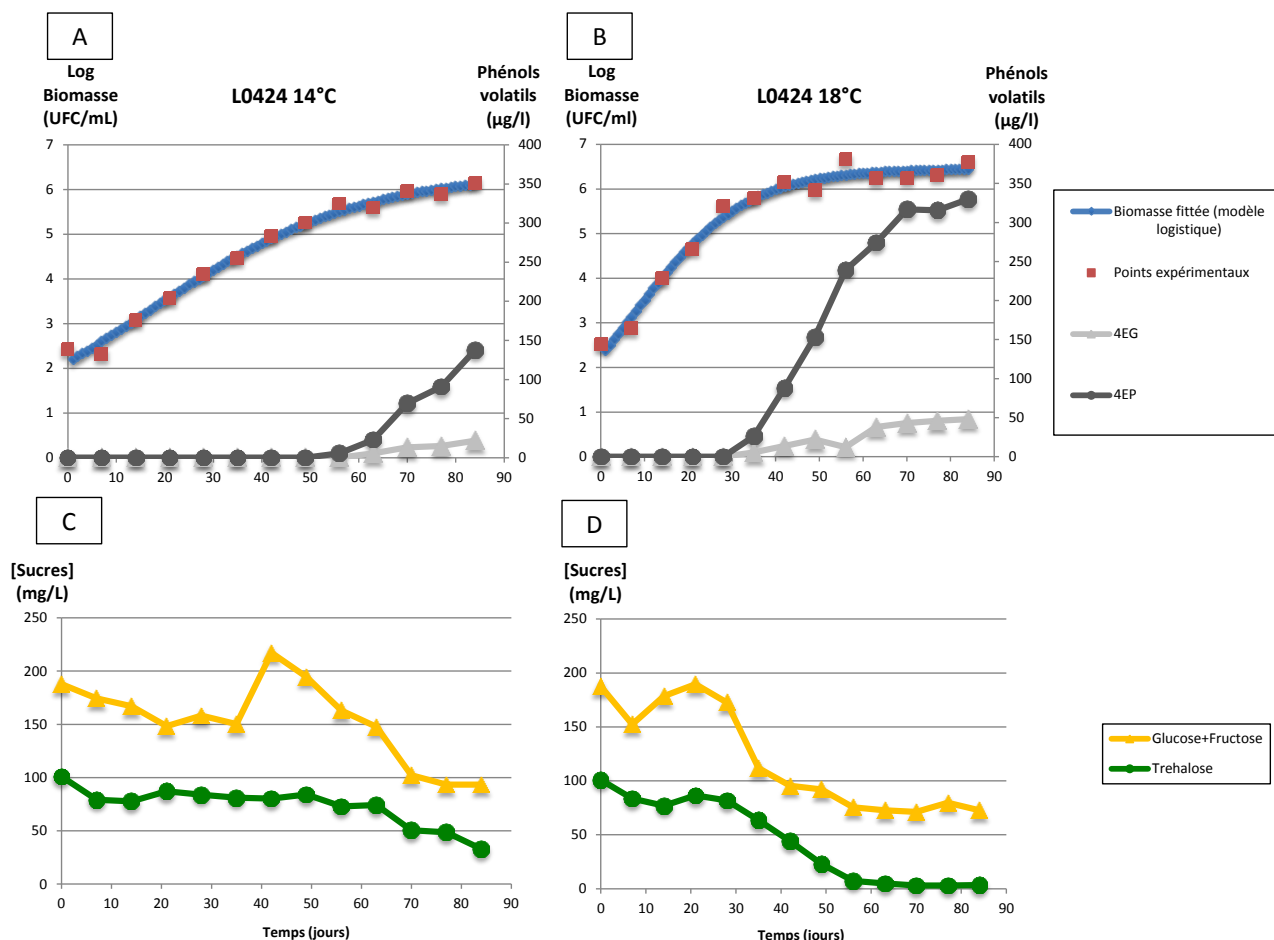


Figure 88 : Représentation de la population cultivable (A et B), des concentrations en 4EP et en 4EG (A et B), des concentrations en glucose, fructose et tréhalose (C et D) de la souche L0424 à 14°C et 18°C.

Tableau 34 : Paramètres de production et de croissance à 14°C et 18°C pour la souche L0424.

	Concentration maximale en 4EP + 4EG (µg/L)	Vitesse de production (µg/jour)*	Vitesse spécifique de production (µg/UFC.jour)*	Vitesse spécifique de croissance (r modèle) (jour ⁻¹)	Jours pour atteindre 426 µg/L
14°C	159	4,55 [49-84j]	0,74 [49-84j]	0,045	94
18°C	401	7,17 [28-84j]	1,09 [49-84j]	0,079	59

- La vitesse maximale de croissance augmente d'un facteur proche de 2 entre 14 et 18°C (Tableau 34). Cela confirme les résultats du suivi mensuel précédemment décrits. Du fait de l'augmentation de la vitesse de croissance, la phase stationnaire est atteinte plus tôt à 18°C (environ 63 jours) qu'à 14°C (>12 semaines).
- La production de phénols volatils (Figure 88 A et B) commence dans les deux cas pendant la phase de croissance et continue pendant la phase stationnaire, ce qui est en accord avec la bibliographie (Dias *et al.* 2003a; Barata *et al.* 2008b; Romano *et al.* 2008).
- La quantité en phénols ainsi que les vitesses spécifiques de croissance et de production moyenne augmentent également avec la température et avec la vitesse maximale de croissance (Tableau 34).

Le dosage de certains mono-, di- et tri saccharides par GC-FID, a montré, dans les limites de la méthode, que seuls le glucose+ fructose et le tréhalose étaient consommés de manière visible par la souche à 14°C et à 18°C (Figures 88 C et D et Tableau 35).

Tableau 35 : Quantité consommée en sucres fermentescibles à 18°C.

Sucre	D-glucose + D-fructose	Tréhalose	Total consommé
14°C	123	54	178
18°C	118	98	229

A 18°C, la consommation de 229,03mg/L (Tableau 35) de sucres fermentescibles a permis une croissance d'environ 3 logs en UFC/mL et la production de 353,47 µg/L de phénols volatils. Cette consommation est observée en fin de phase de croissance de la souche.

- Il est à noter que si le tréhalose a été entièrement consommé à 18°C, il reste 80mg/L de glucose+fructose en fin de culture. Il en est de même pour la culture à 20°C (Résultats non montrés).
- La production en PVs a ici lieu pendant la phase active de consommation de substrat et semble ralentir à l'épuisement des substrats.
- La production de phénols volatils à 18°C continue malgré l'arrêt de la consommation en sources carbonées fermentescibles. Il n'est néanmoins pas à exclure que *B. bruxellensis* utilise d'autres sources carbonées.

1.6 Conclusion

Cette étude avait pour objectif principal de caractériser le niveau de danger lié à la mauvaise maîtrise des températures dans les chais d'élevage l'été. Nous montrons ici que des températures supérieures à 14°C sur des périodes de 3 mois constituent un réel facteur de risque, aggravé par

- la présence de souches parfaitement adaptées au vin (ici la souche L0424, triploïde)
- la présence de populations cultivables initiales élevées.

A 14°C, le seuil de population totale (qPCR) de 10² cell/mL (taux d'inoculation : 10 UFC/mL) semble adapté pour garantir des populations cultivables suffisamment basses (dans les conditions de l'expérience). Néanmoins, le facteur de risque pourrait être mieux apprécié en complétant l'analyse par la mesure de la population viable par exemple par des tests en épifluorescence (population viable). La confrontation de ces différents éléments permettrait en effet d'apprécier le lien entre température, viabilité des levures présentes et production de phénols volatils.

Ces données générées en laboratoire suggèrent qu'une meilleure maîtrise des températures aux chais et/ou un raccourcissement des délais entre deux soutirages participeraient à la maîtrise du développement de *B. bruxellensis* dans les vins. Un sulfitage adapté pourrait compléter ce protocole, à condition que les souches de *B. bruxellensis* présentes soient des souches sensibles et non des souches tolérantes.

2 Influence du groupe génétique sur le développement de *B. bruxellensis* et la production de phénols volatils dans les vins rouges

Dans le cadre de ce projet portant sur le lien entre diversité génétique et diversité phénotypique, les études en milieu modèle ont été complétées par une étude préliminaire dans deux vins.

Pour cela, 9 souches isolées du vin et appartenant aux trois principaux groupes génétiques retrouvés dans cette matrice, ont été retenues :

CBS2499-like (diploïde): CBS2499, 11AVB4, L0611

AWRI1499-like (triploïde): AWRI1499, L0424, L14190

AWRI1608-like (triploïde): AWRI1608, L0422, L14183

Le comportement de ces levures et la production de PVs pouvant varier en fonction du vin considéré, deux vins provenant de châteaux différents (Appellations : Saint-Emilion et Médoc), prélevés au moment de l'élevage ont été utilisés. Le vin A présente un pH de 3,63 et un TAV de

13,49 % vol alors que pour le vin B, ces paramètres sont de 3,48 et de 14,3% vol respectivement. Les vins ont été désulfités avant inoculation, puis les tubes présentant un espace de tête minimal ont été incubés sans agitation.

> Effet matrice du vin sur le développement de souches de *B. bruxellensis*, la production de PVs et la consommation de sucres

La souche L14183 n'a pas présenté de croissance, de production ni de consommation de sucres dans aucun des deux vins. En conséquence, elle ne sera pas prise en compte dans l'interprétation des données. Pour les autres souches, les profils de croissance sont différents en fonction du vin considéré. La croissance des souches est ici associée à la population cultivable déterminée par étalement sur boîte. Dans le vin A, toutes les souches ont vu leur population cultivable augmenter (Figure 89). Dans le vin B, l'adaptation des levures semble plus difficile. Le pH bas et le TAV plus élevé de ce vin peuvent être à l'origine de ces observations. La croissance, lorsqu'elle a lieu, commence dès la 1^{ère} semaine dans le vin A (pour toutes les souches) et au cours de la 2^{nde} dans le vin B.

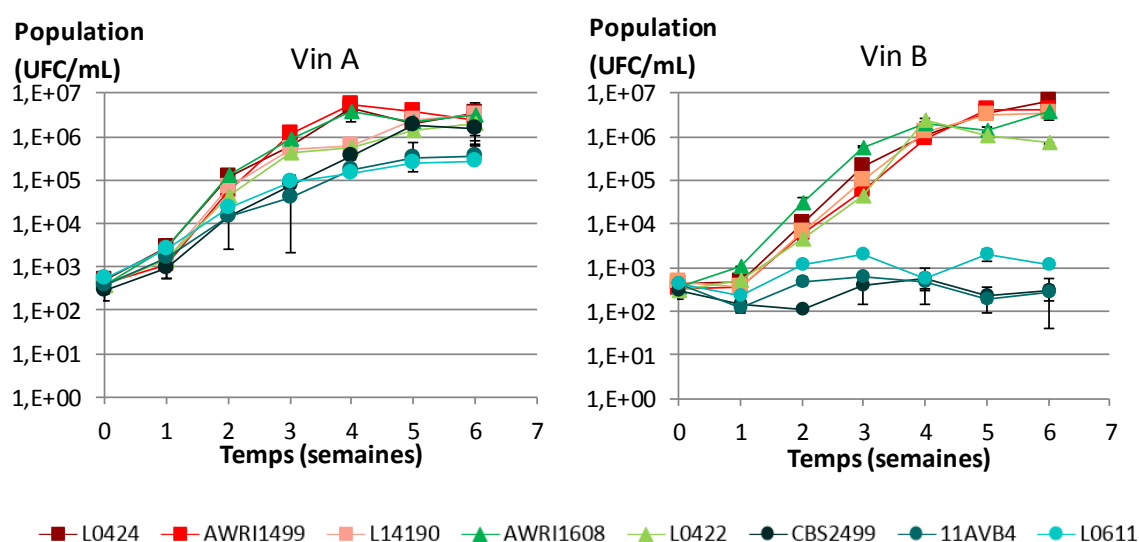


Figure 89 : Profils de croissance de 8 souches de *B. bruxellensis* dans les vins A et B.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats. Les barres d'erreur représentent les écarts entre les réplicats. Les dégradés de couleurs permettent d'identifier le groupe génétique d'appartenance (*AWRI1499*, *AWRI1608* et *CBS2499like*).

Dans le vin A, toutes les souches ont produit des PVs, alors que ce n'est pas le cas dans le vin B (dans les limites de détection de la méthode, figure 90). D'autre part, dans le vin A, la production de phénols volatils est détectable dès 3 semaines et seulement à partir de 5 semaines dans le vin B. Les quantités produites dans le vin A sont, pour toutes les souches, supérieures à celles produites dans le vin B. Certaines souches ont d'ailleurs produit en 6 semaines, des quantités de l'ordre de 1mg/L, soit supérieur au seuil de rejet de 426µg/L de 4EP+4EG (Châtonnet

et al., 1992). D'autre part, les rapports 4EP/4EG obtenus varient entre les deux vins : dans le vin A, ils varient entre 7 et 12 et entre 2 et 4 dans le vin B.

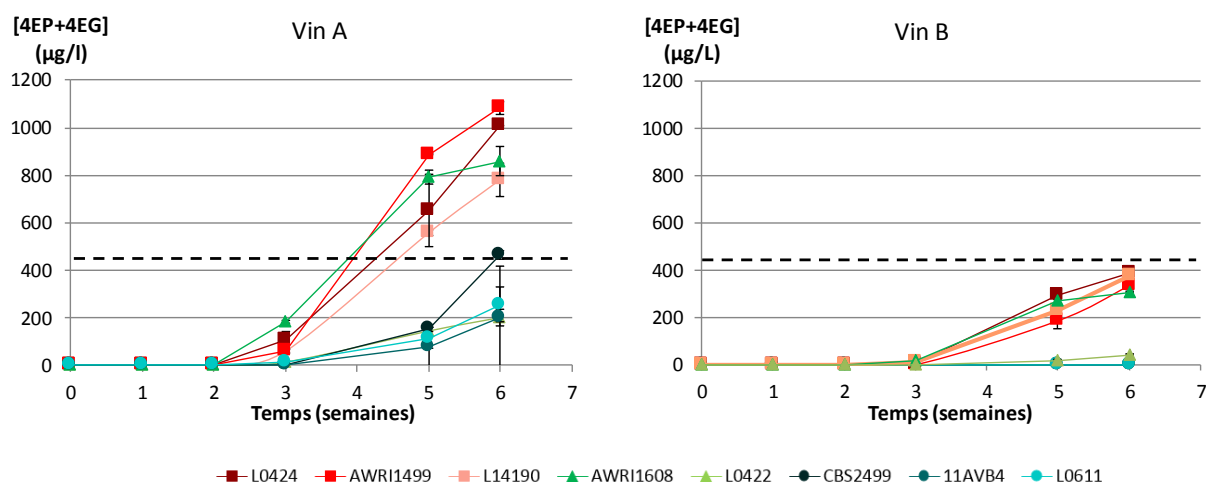


Figure 90 : Profil de production des phénols volatils de 8 souches de *B. bruxellensis* dans les vins A et B.

Les points représentent les moyennes des deux réplicats. Les barres d'erreur représentent les écarts entre les réplicats. Les dégradés de couleurs permettent d'identifier le groupe génétique d'appartenance (AWRI1499, AWRI1608 et CBS2499like). Le point à 4 semaines n'a pu être mesuré (problème technique). Le trait en pointillé matérialise le seuil de rejet communément admis de 426 µg/L.

Enfin, les concentrations en sucres résiduels ont été mesurées en début et en fin de culture (6 semaines) pour chacune des souches (Matériel et méthodes, 6.1).

Les deux vins présentent au départ des concentrations en sucres résiduels différentes. Le vin B est plus concentré en sucres potentiellement consommables par *B. bruxellensis* que le vin A (676 contre 324 mg/L, [Tableau 36](#)).

Tableau 36 : Profil des sucres résiduels des vins A et B.

Sucres (mg/L)	Vin A	Vin B
Glucose + Fructose*	195	440
L-arabinose	63	519
Ribose*	23	27
L-Rhamnose	77	109
Xylose	10	35
Galactose*	21	37
Mannitol	98	41
Sorbitol	99	86
Lactose	25	40
Maltose*	3	13
Tréhalose*	44	91
Cellobiose*	38	68
Mélibiose	21	22
ΣSucres utilisables par <i>B. bruxellensis</i> (mg/L)	324	676

* Sucres utilisables par *B. bruxellensis*.

Nous avons observé les profils et quantités de sucres consommés en fonction des souches dans les deux vins ([Tableau 37](#), [Tableau 38](#), page suivante). Dans les deux vins, il n'y a pas eu de modifications significatives des concentrations de D-xylose, L-arabinose, mélibiose et polyols.

Tableau 37 : Quantités de sucres consommés par des souches* de *B. bruxellensis* pendant 6 semaines de culture dans le vin A (mg/L).

	L0424**	AWRI1499	L14190	AWRI1608	L0422	CBS2499	L0611
Glucose + Fructose	105	104 (3)	102 (5)	105 (0,3)	111 (4)	88 (4)	60 (13)
Tréhalose	40	40 (0,3)	31 (5)	38 (0,2)	40 (1)	1 (1)	18 (4)
Galactose	9	7 (0,7)	14 (2)	12 (2)	17 (0,1)	0 (0,7)	4 (2)
Ribose	4	5 (1)	8 (1)	8 (0,3)	4 (2)	2 (0)	3 (2)
Cellobiose	- 15	- 6 (1)	-1 (1)	0 (1)	- 2 (6)	- 11 (6)	6 (6)
Maltose	- 1	1 (0,6)	0 (0,1)	1 (0,2)	0 (1)	- 1 (1)	1 (1)
Lactose	- 5	- 6 (4)	- 9 (0,2)	- 7 (1)	- 1 (0,1)	- 5 (3)	2 (1)
Total sucres consommés	159	157 (5,6)	155 (13)	164 (3)	173 (7,1)	91 (5,7)	94 (29)
Biomasse produite/ Sucres consommés	4,0*10 ⁸	5,2*10 ⁸	2,3*10 ⁸	3,6*10 ⁸	1,4*10 ⁸	2,4*10 ⁸	4,8*10 ⁷

Les valeurs entre parenthèses représentent les écarts entre les deux réplicats. Les concentrations en sucres sont exprimées en mg/L. Le rapport de la biomasse produite sur les sucres consommés est exprimé en UFC/g.

* Les résultats de la souche 11AVB4 n'ont pu être représentés à cause d'erreurs dans le dosage.

** Seul un des deux réplicats a pu être analysé.

Tableau 38 : Quantités de sucres consommés par des souches* de *B. bruxellensis* pendant 6 semaines de culture dans le vin B (mg/L).

	L0424	AWRI1499	L14190	AWRI1608	L0422	CBS2499	L0611	11AVB4
Glucose + Fructose +	338 (0,6)	338 (3)	342 (5)	352 (1)	348 (6)	-13 (10)	26 (10)	56 (0,3)
Tréhalose	79 (1)	79 (4)	66 (1)	83 (0)	70 (3)	-1 (5)	-2 (3)	3 (3)
Galactose	5 (2)	4 (2)	12 (0,2)	19 (1)	19 (3)	-3 (3)	-1 (1)	0 (0,1)
Ribose	10 (2)	9 (1)	7 (0,5)	8 (1)	8 (0,3)	0 (0,3)	2 (0,2)	1 (0,8)
Cellobiose	15 (3)	15 (0,6)	11 (3)	15 (0,3)	13 (2)	3 (1)	5 (3)	13 (0,1)
Maltose	9 (0,7)	8 (0,3)	7 (0,5)	9 (1)	9 (0,3)	0 (0,3)	1 (0,1)	2 (0,2)
Lactose	8 (3)	7 (1)	8 (1)	6 (0,5)	10 (3)	-1 (4)	0 (2)	7 (4)
Total sucres consommés	464 (12)	460 (12)	453 (11)	492 (4,8)	477 (18)	3 (1)	34 (15)	82 (8)
Biomasse produite/ Sucres consommés	1,2*10 ⁸	1,1*10 ⁸	1,0*10 ⁸	8,4*10 ⁷	5,7*10 ⁷	4,1*10 ⁶	4,7*10 ⁵	5,9*10 ⁵

Les valeurs entre parenthèses représentent les écarts entre les deux réplicats. Les concentrations en sucres sont exprimées en mg/L. Le rapport de la biomasse produite sur les sucres consommés est exprimé en UFC/g.

Dans le vin A, seuls le D-glucose+D-fructose, le tréhalose, le galactose et le ribose ont été consommés, la diminution maximale étant observée avec la souche L0422 : 173mg/L. Dans le vin B, tous les sucres consommables par *B. bruxellensis* ont été en partie consommés, pour une diminution maximale de 492 mg/L (AWRI1608). Chacune des souches a, pour 1g de sucres consommés, produit plus de biomasse dans le vin A que dans le vin B. Par exemple, la souche AWRI1608 a produit $3,6 \cdot 10^8$ UFC/g de sucres dans le vin A contre $5,7 \cdot 10^7$ UFC/g dans le vin B. La consommation de 150 mg/L suffit donc pour atteindre des populations de 10^6 UFC/mL en 6 semaines et la consommation de quantités plus importantes n'est pas nécessairement associée à une croissance plus importante. Par ailleurs, une consommation peut être observée en l'absence de croissance observée : dans le vin A, les souches L0611 et 11AVB4 ont respectivement consommé 34 et 82 mg/L, malgré une population cultivable stable.

> Lien entre les comportements observés et le groupe génétique d'appartenance des souches.

Dans les deux vins, on peut distinguer deux groupes de souches : les souches triploïdes du groupe AWRI1499-like et la souche AWRI1608 d'un côté, les souches du groupe diploïde de l'autre. Le cas de la souche L0422 sera traité à part. Dans le vin A notamment, toutes les souches ont vu leurs populations augmenter mais à des vitesses différentes. Ainsi, les populations des souches triploïdes L0424, AWRI1499 et AWRI1608 augmentent jusqu'à 4 semaines, puis se maintiennent. Celles des souches L0422 et L14190 augmentent jusqu'à 6 semaines. Les quantités produites par ces souches dans le vin A dépassent le seuil de rejet de 4EP+4EG de 426 µg/L dans le vin dès 5 semaines d'expérimentation (Chatonnet *et al.*, 1992). Lors de l'arrêt de la culture, à 6 semaines, les souches L0424 et AWRI1499 ont produit plus de 1mg/L de phénols volatils. Toujours dans le vin A, des PVs sont détectés dès 3 semaines de culture pour les souches diploïdes. Néanmoins, à 6 semaines, les quantités sont 2 à 5 fois inférieures à celles produites par les souches triploïdes et, à l'exception de CBS2499 (moyenne de 463µg/L de PVs à 6 semaines), ces quantités sont inférieures au seuil de rejet.

Dans le vin B, toutes les souches triploïdes présentent une augmentation de leur population cultivable jusqu'à 10^6 UFC/mL à 6 semaines. Les profils de croissance sont assez similaires entre ces souches. Dans ce vin, les souches du groupe triploïde AWRI1499-like et la souche AWRI1608 ne produisent pas plus de 400 µg/L en 6 semaines. Dans ce même vin, les populations cultivables des souches diploïdes se maintiennent mais n'augmentent pas, et ces souches ne produisent pas de phénols volatils. La souche triploïde L0422 (AWRI1608-like) présente un comportement intermédiaire. Dans le vin A, elle présente un profil de production similaire aux souches diploïdes. Et dans le vin B, contrairement aux souches diploïdes, elle produit des quantités faibles mais détectables de phénols volatils (41 µg/L ± 2 à 6 semaines).

Enfin, dans les vins A et B, les souches triploïdes ont consommé significativement plus de sucres que les souches diploïdes.

La production en phénols volatils plus importante par les souches triploïdes dans le vin A suggère des capacités de production plus importante. Néanmoins, les calculs de rendements en phénols volatils (PV/population cultivable, [Figure 91](#)) montrent que si les souches triploïdes présentent une meilleure croissance, les rendements de production restent du même ordre de grandeur quelque soit le groupe génétique de la souche. Ils sont même, pour les trois souches du groupe CBS2499-like supérieurs à 6 semaines par rapport aux autres souches.

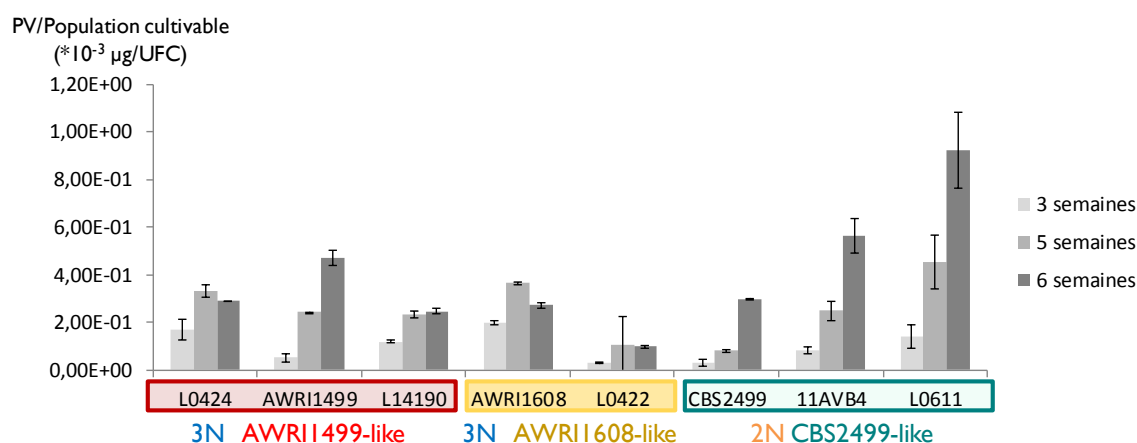


Figure 91 : Rendements de production en phénols volatils des souches de *B. bruxellensis* dans le vin A.

Il est à noter que dans les milieux modèles (chapitre 2), la population cultivable de la souche L0424 diminuait tout au long de la culture alors que dans le vin, sa population cultivable augmente. Les levures ont donc des comportements différents selon leur environnement et il est difficile de prédire des résultats dans le vin à partir de tests en milieu modèle.

Discussion

Ces travaux confirment que dans le vin et sans apport d'oxygène, les souches peuvent présenter un comportement très différent de celui observé en milieu modèle. Les études en milieu modèle permettent de faire des observations générales, mais ne permettent pas de conclure quant aux comportements des souches dans le vin comme l'avait observé Coronado *et al.* (2015). Ainsi, la souche L0424 dont la population cultivable diminuait en milieu modèle (sans apport d'oxygène), présente une croissance importante dans le vin (également observée dans la partie précédente). Par ailleurs, comme observé par Romano *et al.* (2009), le comportement des souches varie en fonction du vin considéré. Dans le vin B qui présente un TAV de 14,3% v/v et un pH 3,48,

les souches du groupe diploïde n'ont pas présenté d'augmentation de leur population cultivable et n'ont pas produit de phénols volatils suggérant une sensibilité plus importante à l'un ou l'autre de ces paramètres. Dans ce même vin, les populations cultivables des souches des groupes triploïdes ont augmenté moins rapidement et les quantités produites sont inférieures à celles du vin A (13,49% v/v, pH 3,63). Dans le vin A, les populations cultivables des souches diploïdes augmentent plus lentement. Ainsi les souches du groupe triploïde AWRI1499-like seraient possiblement plus adaptées au milieu vin. Ceci est en adéquation avec le fait que la majorité des souches de ce groupe ont été isolées du vin (Avramova *et al.*, soumis). Ces capacités, associées à une tolérance plus importante aux sulfites que les individus des autres groupes pourraient en faire des contaminants redoutables dans le vin. Ces souches triploïdes pourraient présenter de meilleures capacités d'adaptation et donc produire des quantités détectables de phénols volatils plus précocement que les souches diploïdes. Néanmoins, il est à considérer que ces dernières, lorsqu'on leur laisse du temps, sont également capable de produire des phénols volatils.

Enfin, Chatonnet *et al.* (1992) montraient que la consommation de 335 mg/L de sucres était suffisante pour la production de quantités supérieures au seuil de rejet des vins (426 µg/L en [4EP+4EG]. Dans le vin A, la consommation de 160 mg/L en moyenne est suffisante pour supporter une augmentation de près de 4 log de la population cultivable associée à une production de l'ordre du mg/L en phénols volatils. Néanmoins, les quantités de sucres consommés varient entre les deux vins et selon les souches, les consommations supérieures ne sont pas nécessairement associées à des populations cultivables ou concentrations en phénols volatils plus importantes (en accord avec Coulon *et al.*, 2009). Ainsi, dans le vin B, les souches consomment un plus large panel de sucres et des quantités presque trois fois plus importantes que dans le vin A, peut-être parce que la survie des levures est plus difficile dans ce vin-là.

Crauwels *et al.* (2017) mettaient en évidence l'influence de la matrice d'origine sur les capacités d'adaptation des souches au vin, les isolats du vin étant les plus adaptés à cette matrice. Nos travaux suggèrent qu'il existe également des différences importantes dans les capacités d'adaptation parmi les souches isolées du vin. Le groupe génétique d'appartenance et le niveau de ploïdie semblent influencer sur ces variabilités. En conséquence, l'étude plus approfondie des réarrangements génomiques et du niveau de ploïdie de l'espèce *B. bruxellensis* sera nécessaire à l'élucidation de mécanismes d'adaptation de cette espèce à son environnement et notamment au vin.

Conclusion

Brettanomyces bruxellensis est une levure d'intérêt de part ses capacités de survie et d'adaptation qui en font une menace (vin) mais qui sont également une opportunité pour la diversification des produits et l'amélioration des rendements (bière, kombucha, bioéthanol). Les travaux menés ces 15 dernières années ont montré que l'espèce *B. bruxellensis* présentait une diversité génétique et phénotypique importante. En conséquence, une approche holistique est nécessaire à la caractérisation de cette espèce.

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de mieux caractériser la diversité génétique et phénotypique de l'espèce *B. bruxellensis* afin de mieux cerner/prédire ses capacités d'adaptation dans les milieux dans lesquels elle est généralement retrouvée et, notamment, le vin.

Dans ce cadre-là, nous avons isolé puis étudié la diversité génétique d'une collection importante d'isolats du vin de *B. bruxellensis* de différentes régions viti-vinicoles et millésimes. L'utilisation des outils microsatellites a permis d'analyser la structuration de ces populations du vin à différentes échelles géographiques. Nos travaux confirment ainsi une diversité importante de l'espèce notamment en ce qui concerne les isolats de vins, chez lesquels l'état polyploïde est communément retrouvé. Ainsi, l'état triploïde est largement répandu et présent dans des régions du monde entier, où il coexiste avec l'état diploïde. Cette coexistence est également relevée au sein de différentes régions viticoles étudiées mais également, à l'échelle d'un chai et d'un vin. De manière intéressante, la présence d'individus des groupes génétiques triploïdes dans des millésimes dits anciens (antérieurs à 1990) n'a pas été observée contrairement aux individus du groupe diploïde CBS2499-like. De plus, ces populations triploïdes apparaissent plus clonales et moins château-spécifiques que celles des isolats diploïdes, ce qui suggère une installation plus récente de ces populations dans le vignoble bordelais. En outre, la présence de certains génotypes dans de nombreux pays éloignés géographiquement suggère leur dispersion à travers le monde ainsi qu'une adaptation importante de ces individus au milieu vin. L'émergence de ces génotypes dans ces différentes régions de manière indépendante reste possible et soulignerait une fois encore, le fort potentiel d'adaptation de ces souches au milieu vin.

Le maintien de l'état triploïde est généralement associé à des mécanismes permettant aux organismes de mieux survivre au milieu dans lequel ils ont émergé. Ainsi, il a récemment été montré que chez *B. bruxellensis*, l'état triploïde est associé à une meilleure tolérance aux sulfites, agent antimicrobien couramment utilisé dans les vins, notamment comme outil de lutte contre le risque « Brett ».

L'influence de la polyploïdie (à travers le groupe génétique d'appartenance) et de la matrice d'origine sur la capacité des souches à consommer différents sucres et à produire des phénols volatils a été étudiée. Les deux méthodes de phénotypage « sucre » utilisées dans cette

étude suggèrent que l'espèce *B. bruxellensis* présente peu de diversité en termes de profils de sucres consommés. En outre, malgré des origines en substrat différentes, toutes les souches sont capables de produire des phénols volatils, suggérant que ceci est une caractéristique très conservée de l'espèce. Crauwels (2017) avait notamment remarqué que les gènes codant pour les deux enzymes impliquées dans la réaction de production de ces composés étaient conservés chez toutes les souches. Néanmoins, nos données suggèrent une variabilité importante entre les souches en termes de profils de croissance. Bien que ces variations n'altèrent pas les capacités intrinsèques des souches à produire des PVs, elles mènent à une modification de la cinétique globale d'accumulation des PVs dans les milieux. Ces différences sont notamment associées à des comportements singuliers en fonction des conditions d'oxygénation du milieu. La tolérance à des concentrations élevées en éthanol pourrait également être un facteur de différenciation des comportements des souches. Ces données nous ont ainsi permis de révéler la complexité et la variabilité de cette espèce.

Ces travaux étaient associés à une collaboration étroite avec des châteaux du vignoble bordelais. Dans l'objectif de prédire ou de contrôler le risque associé à la présence de *B. bruxellensis*, nous avons étudié l'influence de la composition en sources carbonées résiduelles sur le développement de cette levure dans les vins. Nous avons ainsi pu observer que la période du premier été d'élevage est fréquemment associée à l'altération des vins, confirmant les observations de Chatonnet (1992). Nos études confirment aussi la capacité de cette espèce de se développer de manière importante (4 log en UFC/mL) sur de faibles quantités de sucres dans les vins (100 à 300 mg/L). En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de liens clairs entre les profils ou des quantités de sucres présents et l'altération subséquente des vins par ce microorganisme.

L'analyse des comportements des souches de *B. bruxellensis* en milieu modèle et des phénomènes de contamination récurrents pendant le 1^{er} été d'élevage en barrique nous ont amenés à étudier le comportement des souches dans le vin. Nous avons dans un premier temps, mis en évidence des variations importantes de la température dans les chais au cours de l'année, avec des amplitudes pouvant aller jusqu' à 6°C d'écart d'une saison à l'autre. Les essais en laboratoire montrent que le seuil de 14°C ne devrait pas être dépassé afin de contenir le développement sur les périodes inter-soutirages de 2 à 3 mois. Par ailleurs, il apparaît clairement que les individus des groupes génétiques triploïdes AWRI1608-like et AWRI1499-like, présentent de meilleures capacités de survie et de développement dans les vins, et notamment les vins dits difficiles (pH bas et concentration en éthanol élevée), que les individus diploïdes du groupe CBS2499-like. Ces différences de comportement pourraient, comme observé en milieu modèle, être liées à une meilleure tolérance des individus de ces groupes aux concentrations élevées en

éthanol et/ou au pH bas des vins. De manière non exclusive, cela pourrait également être associé à des régulations métaboliques plus complexes notamment en conditions de limitation en oxygène, telles qu'observées dans les barriques.

Si les résultats présentés permettent d'obtenir une image plus précise de la diversité génétique et de la variabilité phénotypique de l'espèce *B. bruxellensis* en milieu modèle et dans le vin, de nombreux aspects restent encore à étudier.

Tout d'abord, l'étude préliminaire en laboratoire devra être complétée par l'étude de l'impact de la régulation de la température dans les chais sur le développement de *B. bruxellensis* en barrique et notamment pendant le 1^{er} été d'élevage. Ceci permettra de définir des préconisations raisonnables et adaptées au travail de chai.

L'étude écologique préliminaire menée au cours de cette thèse devra être complétée par l'analyse d'un nombre plus important d'isolats du vin provenant des pays autres que la France. Cela permettra d'obtenir une représentation plus réaliste et précise de la diversité et de la dispersion des individus à l'échelle du globe. De plus, du fait de leur taux de mutation important comparativement au reste du génome, l'analyse des séquences microsatellites permet d'étudier la diversité génétique d'une population à un instant t. Afin de mieux cerner les événements ayant conduit à la divergence et à l'évolution de l'espèce, ces analyses devront en conséquence être complétées par le séquençage des génomes de plusieurs isolats de chaque groupe génétique identifié.

Du point de vue de la poursuite des études physiologiques, la variabilité importante observée entre nos souches en milieu modèle montre qu'il faudra, en premier lieu, développer un milieu défini non limitant et adapté pour chacun des groupes de souches étudiées. Cela nécessitera dans un premier temps d'identifier les facteurs limitants du milieu et les origines de cette variabilité. Il conviendra également sur un nombre plus important de souches, d'identifier et de comparer les mécanismes métaboliques, les gènes impliqués et leur niveau d'expression en fonction des conditions d'oxygénation du milieu. Idéalement, ces expériences devront être menées en fermenteur permettant ainsi de contrôler finement les conditions d'aération du milieu, tout en maintenant le milieu homogène. Nous avons vu en effet, à plusieurs reprises que ces levures avaient tendance à fortement sédimenter en conditions non agitées ou en agitation modérée. Les travaux préliminaires menés sur les préférences en substrat de l'espèce devront également être répétées en fermenteur dans des conditions d'aération limitantes contrôlées. Ces études pourraient être particulièrement intéressantes pour les industries brassicoles et de production de bioéthanol qui visent à diversifier leurs produits ou à optimiser leur production par le biais de cette levure. L'influence du niveau de ploïdie sur la tolérance aux facteurs abiotiques

(éthanol, pH) en milieu modèle ou en milieu vin devra également être investiguée. Elle permettra de mieux appréhender l'origine des capacités d'adaptation plus importantes des individus triploïdes au vin. Les capacités de dégradation d'oses complexes par *B. bruxellensis* pourraient également en partie expliquer ses capacités de développement importantes dans le vin. En conséquence, l'identification des capacités de cette espèce à utiliser des polysaccharides et oligosaccharides du vin ainsi que les activités enzymatiques mises en jeu pourrait compléter ce travail.

Si elle est plus fréquemment associée à la période du premier été d'élevage en barrique, le développement de *B. bruxellensis* est néanmoins possible à toutes les étapes de la vinification et notamment pendant l'élevage. En conséquence, une étude des variations en sucres résiduels tout au long de l'élevage permettrait d'apprécier, sur une plus longue échelle de temps, les variations en sucres résiduels associées ou pas à la présence et au développement de *B. bruxellensis*. Ces analyses devront être complétées par des suivis de la population, des sucres et des concentrations en phénols volatils présents dans les lies.

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux espèces présentes dans le vin en barrique pendant l'élevage et à leurs effets et/ou interactions. Il est ainsi possible que le microbiote présent dans un vin influence de manière positive ou négative les capacités de développement et d'altération des vins par *B. bruxellensis*. Une étude récente met notamment en évidence de possibles effets de synergie entre les bactéries et levures (dont *B. bruxellensis*) résultant dans des phénomènes d'altération dans les boissons non alcoolisées (Kregiel *et al.*, 2017). Des études de métagénomique réalisées sur des échantillons de vin permettront d'identifier les espèces en présence en fonction des vins analysés. L'analyse du microbiote des lies serait particulièrement intéressante. Des études sur le fonctionnement de ce microbiote ou de formes simplifiées, en milieu modèle ou dans le vin permettront alors d'évaluer l'impact de ces espèces sur le développement et les capacités d'altération de *B. bruxellensis*.

Références bibliographiques

- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., and Nuti, M. (2007).** Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science* 19, 153–164.
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., Foschino, R., and Nuti, M. (2009).** Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology* 130, 238–244.
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., and Nuti, M. (2010).** Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* 143, 76–80.
- Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M.L., and Strehaiano, P. (2000).** Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 46, 1046–1050.
- Aguilar Uscanga, M.G., Délia, M.-L., and Strehaiano, P. (2003).** *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 157–162.
- del Alamo, M., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., and Gómez-Cordovés, C. (2000).** Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. *Food Chemistry* 71, 189–193.
- Alañón, M.E., Ruiz-Matute, A.I., Martínez-Castro, I., Díaz-Maroto, M.C., and Pérez-Coello, M.S. (2009).** Optimisation of pressurised liquid extraction for the determination of monosaccharides and polyalcohols in woods used in wine aging. *J. Sci. Food Agric.* 89, 2558–2564.
- Alañón, M.E., Rubio, H., Díaz-Maroto, M.C., and Pérez-Coello, M.S. (2010).** Monosaccharide anhydrides, new markers of toasted oak wood used for ageing wines and distillates. *Food Chemistry* 119, 505–512.
- Albertin, W., and Marullo, P. (2012).** Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 279, 2497–2509.
- Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., and Sicard, D. (2011).** Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control. *Appl Environ Microbiol* 77, 2772–2784.
- Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., and Masneuf-Pomarede, I. (2014).** Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiology* 42, 188–195.
- Albino, E.A. (2011).** A survey of *Brettanomyces/Dekkera* strains for differences in aroma production. University of California.
- Álvarez, I., Aleixandre, J.L., García, M.J., and Lizama, V. (2006).** Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* 563, 109–115.

- Anderson, M.J. (2001).** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32–46.
- Anderson, M.J. (2006).** Distance-Based Tests for Homogeneity of Multivariate Dispersions. *Biometrics* 62, 245–253.
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., and Mas, A. (2010).** Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 144, 257–262.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M., and Doco, T. (2013).** Polysaccharide Composition of Monastrell Red Wines from Four Different Spanish Terroirs: Effect of Wine-Making Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2538–2547.
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Mazerolles, G., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M., and Doco, T. (2014a).** Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four different wine-growing origins in Spain. *Food Chemistry* 156, 151–159.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. m., Ros-García, J. m., and Doco, T. (2014b).** Effect of winemaking techniques on polysaccharide composition of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 62–71.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Williams, P., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M., and Doco, T. (2015).** Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines. *Food Chemistry* 179, 311–317.
- Arjun, V.M. (1979).** *Biology and activities of yeasts* (London: Academic Press Inc.).
- Arvik, T., and Henick-Kling, T. (2005).** Synthèse: Apparition de *Brettanomyces bruxellensis*, multiplication et impact sur les arômes du vin. (New York, USA: Vinidea.net, wine internet technical journal), pp. 1–9.
- Avramova (2017).** Population genetics and diversity of the species *Brettanomyces bruxellensis*: a focus on sulphite tolerance.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., and León, D. (2004).** Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta* 513, 29–39.
- Bağder Elmaci, S., Gülgör, G., Tokatli, M., Erten, H., İşci, A., Özçelik, F. (2015).** Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 675–686.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2008a).** Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121, 201–207.

- Barata, A., Pagliara, D., Piccininno, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2008b).** The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research* 8, 1097–1102.
- Barata, A., Laureano, P., D’Antuono, I., Martorell, P., Stender, H., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., and Loureiro, V. (2013).** Enumeration and Identification of 4-Ethylphenol Producing Yeasts Recovered from the Wood of Wine Ageing Barriques after Different Sanitation Treatments. *Journal of Food Research* 2, 140.
- Barbaresi, A., Torreggiani, D., Benni, S., and Tassinari, P. (2015).** Indoor air temperature monitoring: A method lending support to management and design tested on a wine-aging room. *Building and Environment* 86, 203–210.
- Barbin, P., Cheval, J.-L., Gilis, J.-F., Strehaiano, P., and Taillandier, P. (2008).** Diversity in Spoilage Yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* Isolated from French Red Wine. Assessment During Fermentation of Synthetic Wine Medium. *Journal of the Institute of Brewing* 114, 69–75.
- Barham, E. (2003).** Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. *Journal of Rural Studies* 19, 127–138.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. (1990).** Yeasts : characteristics and identification (Cambridge, England: Cambridge University Press).
- de Barros Pita, W., Leite, F.C.B., Liberal, A.T. de S., Simões, D.A., and Morais, M.A. de (2011).** The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek* 100, 99–107.
- de Barros Pita, W., Silva, D.C., Simões, D.A., Passoth, V., and Jr, M.A. de M. (2013a).** Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 855–868.
- de Barros Pita, W., Tiukova, I., Leite, F.C.B., Passoth, V., Simões, D.A., and de Morais, M.A. (2013b).** The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. *Yeast* 30, 111–117.
- Baumes, R., Bayonove, C., Barillere, J.M., Escudier, J.L., and Cordonnier, R. (1988).** La macération pelliculaire dans la vinification en blanc. Incidence sur la composante volatile des moûts. *Connaissance de La Vigne et Du Vin* 22, 209–223.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., and Suárez-Lepe, J. a. (2009a).** Factors Affecting the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase Activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* Control in Red Wine Making. *Journal of Food Science* 74, M15–M22.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Uthurry, C., and Suárez-Lepe, J.A. (2009b).** Minimization of ethylphenol precursors in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 132, 145–152.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2005).** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology Annual Review*, (Elsevier), pp. 127–152.

- Bertrand, A., Dubernet, M.O., & Ribéreau-Gayon, P. (1975).** Le tréhalose, principal diholoside des vins. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris series D, 1907–1910.
- Blackwell, K.J., Singleton, I., and Tobin, J.M. (1995).** Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 43, 579–584.
- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J., and Passoth, V. (2010).** Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1487–1497.
- Blomqvist, J., Nogué, V.S., Gorwa-Grauslund, M., and Passoth, V. (2012).** Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast* 29, 265–274.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., and Galzy, P. (1982).** A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2031–2037.
- Bochner, B.R., Gadzinski, P., and Panomitros, E. (2001).** Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function. *Genome Res* 11, 1246–1255.
- Boer, V.M., Tai, S.L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M.C., Piper, M.D.W., De Winde, J.H., Pronk, J.T., and Daran, J.-M. (2007).** Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research* 7, 604–620.
- Boidron, J.N., Chatonnet, P., and Pons, A. (1988).** Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance de La Vigne et Du Vin* 22, 275–294.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., and Mills, D.A. (2012).** Brewhouse-Resident Microbiota Are Responsible for Multi-Stage Fermentation of American Coolship Ale. *PLOS ONE* 7, e35507.
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., and Curtin, C.D. (2014).** Insights into the *Dekkera bruxellensis* Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLOS Genetics* 10, e1004161.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., and Kunkee, R.E. (1996).** Principles and Practices of Winemaking (New York, USA: Chapman Hall).
- Brandam, C., Castro-Martínez, C., Délia, M.-L., Ramón-Portugal, F., and Strehaiano, P. (2007).** Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Can. J. Microbiol.* 54, 11–18.
- Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957).** An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27, 325–349.
- Bruvo, R., Michiels, N.K., D'souza, T.G., and Schulenburg, H. (2004).** A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* 13, 2101–2106.
- Buchanan, R.E. (1918).** Life Phases in a Bacterial Culture. *The Journal of Infectious Diseases* 23, 109–125.

- Cai, J., Zhu, B.-Q., Wang, Y.-H., Lu, L., Lan, Y.-B., Reeves, M.J., and Duan, C.-Q. (2014).** Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry* 154, 217–229.
- Cajueiro, D.B.B., Parente, D.C., Leite, F.C.B., Junior, M.A. de M., and de Barros Pita, W. (2017).** Glutamine: a major player in nitrogen catabolite repression in the yeast *Dekkera bruxellensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1–12.
- Calderon, F., Morata, A., Uthurry, C., and Suárez, J. (2004).** Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica. *Ultimos Avances Technologicos. Tecnologia Del Vino*. 16, 49–54.
- Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V., and Cocolin, L. (2010).** Prevalence and Biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine from Northwestern Italy. *Am J Enol Vitic.* 61, 486–491.
- Capozzi, V., Di Toro, M.R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., Russo, P., Orrù, L., Alexandre, H., and Spano, G. (2016).** Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiology* 59, 196–204.
- Capusoni, C., Arioli, S., Zambelli, P., Moktaduzzaman, M., Mora, D., and Compagno, C. (2016).** Effects of Oxygen Availability on Acetic Acid Tolerance and Intracellular pH in *Dekkera bruxellensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4673–4681.
- Carmona, L., Varela, J., Godoy, L., and Ganga, M.A. (2016).** Comparative proteome analysis of *Brettanomyces bruxellensis* under hydroxycinnamic acid growth. *Electronic Journal of Biotechnology* 23, 37–43.
- Carrasco-Sánchez, V., John, A., Marican, A., Santos, L.S., and Laurie, V.F. (2015).** Removal of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol with Polyaniline-Based Compounds in Wine-Like Model Solutions and Red Wine. *Molecules* 20, 14312–14325.
- Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., and Romano, P. (2002).** Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 159–163.
- Castro Martinez, C. (2007).** *Brettanomyces bruxellensis*: Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux. PhD Thesis.
- Chandra, M., Madeira, I., Coutinho, A.-R., Albergaria, H., and Malfeito-Ferreira, M. (2015).** Growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* in different grapevine varieties during fermentation and in finished wine. *Eur Food Res Technol* 1–8.
- Charpentier, C., and Feuillat, M. (1993).** Yeast autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, G.H. Fleet, ed. (Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers), pp. 225–242.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., and Pons, M. (1992).** The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Scientific Food and Agriculture* 165–178.

- Chatonnet, P., Boidron, J.-N., and Dubourdieu, D. (1993).** Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthyl-phenols. *OENO One* 27, 277–298.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J.N. (1995).** The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenols content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 463-468.
- Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H., and Dols-Lafargue, M. (2016).** Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC Genomics* 17, 984.
- Claussen, N.H. (1904).** On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *Journal of the Institute of Brewing* 10, 308–331.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., and Comi, G. (2004).** Molecular Detection and Identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in Spoiled Wines. *Appl Environ Microbiol* 70, 1347–1355.
- Comai, L. (2005).** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6, 836–846.
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J.M., Blumwald, E., Chaves, M.M., and Gerós, H. (2015).** Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *J Exp Bot* 66, 889–906.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H. (2007).** Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality.
- Connell, L., Stender, H., and Edwards, C.G. (2002).** Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am J Enol Vitic.* 53, 322–324.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., and Bisson, L.F. (2006).** Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Coronado, P., Aguilera, S., Carmona, L., Godoy, L., Martínez, C., and Ganga, M.A. (2015).** Comparison of the behaviour of *Brettanomyces bruxellensis* strain LAMAP L2480 growing in authentic and synthetic wines. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 1217–1223.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006).** Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130–135.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., and Coton, E. (2017).** Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 93.

- Coulon, J., Perello, M. C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., and Renouf, V. (2009).** *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1450–1458.
- Coulter, A., Robinson, E., Cowey, G., Francis, I.L., Lattey, K., Capone, D., Gishen, M., and Godden, P.W. (2004).** *Dekkera/Brettanomyces* yeast - an overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control. S. Bell, K. de Garis, C. Dundon, R. Hamilton, S. Partridge, and G. Wall, eds. (Barossa, Australia: Australian Society of Viticulture and Oenology), pp. 51–55.
- Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., Samblanx, G.D., Marchal, K., Willems, K.A., Verstrepen, K.J., and Lievens, B. (2014).** Assessing Genetic Diversity among *Brettanomyces* Yeasts by DNA Fingerprinting and Whole-Genome Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4398–4413.
- Crauwels, S., Assche, A.V., Jonge, R. de, Borneman, A.R., Verreth, C., Troels, P., Samblanx, G.D., Marchal, K., Peer, Y.V. de, Willems, K.A., et al. (2015).** Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–12.
- Crauwels, S., Opstaele, F.V., Jaskula-Goiris, B., Steensels, J., Verreth, C., Bosmans, L., Paulussen, C., Herrera-Malaver, B., Jonge, R. de, Clippeleer, J.D., et al. (2017).** Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *FEMS Yeast Research* fow105.
- Curtin, C.D., and Pretorius, I.S. (2014).** Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Yeast Research* 14, 997–1005.
- Curtin, C., Kennedy, E., and Henschke, P. a. (2012a).** Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Letters in Applied Microbiology* 55, 56–61.
- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., and 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., and Pretorius, I.S. (2012b).** De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. *PLoS ONE* 7, e33840.
- Custer, M.T.J. (1940).** Onderzoekingen over het Gistglascht *Brettanomyces*. Delft University of Technology.
- Darriet, P., Boidron, J.-N., and Dubourdieu, D. (1988).** L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat à petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *OENO One* 22, 189–195.
- Davenport, R.R. (1976).** Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*, C.H. Dickinson, and T.F. Preece, eds. (London: Academic Press), pp. 325–351.

- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H., and Fleet, G.H. (1985).** Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *Am J Enol Vitic.* *36*, 290–301.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H., and Fleet, G.H. (1986).** Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 539–545.
- De Beer, D., Joubert, E., Marais, J., and Manley, M. (2006).** Maceration before and during fermentation : effect on pinotage wine phenolic composition, total antioxidant capacity and objective colour parameters.
- Delaherche, A., Claisse, O., and 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*, 910–915.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., and Ambrò, S. (2002).** Fermentability of Grape Must after Inhibition with Dimethyl Dicarboxylate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.* *50*, 5605–5611.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., and Freimer, N.B. (1994).** Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3166–3170.
- Di Toro, M.R., Capozzi, V., Beneduce, L., Alexandre, H., Tristezza, M., Durante, M., Tufariello, M., Grieco, F., and Spano, G. (2015).** Intraspecific biodiversity and 'spoilage potential' of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT - Food Science and Technology* *60*, 102–108.
- Diallo, A.M. (2015).** Coexistence and performance of diploid and polyploid *Acacia senegal* (L.) Willd.: implications for adaptation and domestication in the Sahel. PhD-Thesis. Department of Geosciences and Natural Resource Management, University of Copenhagen.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2003a).** Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* *20*, 567–574.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2003b).** Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology* *20*, 377–384.
- Dickinson, J.R. (1996).** 'Fuse 1' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* *142*, 1391–1397.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., and Collins, M.D. (1995).** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* *45*, 395–397.
- van Dijken, J.P., and Scheffers, W.A. (1986).** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* *32*, 199–224.

- Dimopoulou, M., Hazo, L., and Dols-Lafargue, M. (2012).** Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *International Journal of Food Microbiology* 153, 114–122.
- Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., et al. (2014).** Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni*: From Genes to Phenotypes. *PLOS ONE* 9, e98898.
- Divol, B., and Lonvaud-Funel, A. (2005).** Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology* 99, 85–93.
- Doco, T., Williams, P., and Cheynier, V. (2007).** Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6643–6649.
- Dols-Lafargue, M., Gindreau, E., Le Marrec, C., Chambat, G., Heyraud, A., and Lonvaud-Funel, A. (2007).** Changes in Red Wine Soluble Polysaccharide Composition Induced by Malolactic Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9592–9599.
- Domercq, S. (1956).** Etude et classification des levures de vin de la Gironde. PhD Thesis. Université de Bordeaux.
- Domínguez, C., Guillén, D.A., and Barroso, C.G. (2002).** Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta* 458, 95–102.
- du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and 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.
- Duarte, F.L., Coimbra, L., and Baleiras-Couto, M. (2017).** Filter Media Comparison for the Removal of *Brettanomyces bruxellensis* from Wine. *Am J Enol Vitic. ajev.2017.17003*.
- Dubernet, M. (1974).** Recherches sur la tyrosinase de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications technologiques. PhD Thesis. Université de Bordeaux II.
- Ducasse, M.-A., Williams, P., Meudec, E., Cheynier, V., and Doco, T. (2010).** Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. *Carbohydrate Polymers* 79, 747–754.
- Ducasse, M.-A., Williams, P., Canal-Llauberes, R.-M., Mazerolles, G., Cheynier, V., and Doco, T. (2011).** Effect of Macerating Enzymes on the Oligosaccharide Profiles of Merlot Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6558–6567.
- Duckitt, E. (2012).** Investigating the impact of sulphur dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a molecular and cellular level. Thesis. Stellenbosch : Stellenbosch University.
- Dweck, H.K.M., Ebrahim, S.A.M., Farhan, A., Hansson, B.S., and Stensmyr, M.C. (2015).** Olfactory Proxy Detection of Dietary Antioxidants in *Drosophila*. *Current Biology* 25, 455–466.
- Edlin, D.A.N., Narbad, A., Gasson, M.J., Dickinson, J.R., and Lloyd, D. (1998).** Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 232–239.

- Fabrizio, V., Vigentini, I., Parisi, N., Picozzi, C., Compagno, C., and Foschino, R. (2015).** Heat inactivation of wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by hot water treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* *61*, 186–191.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., and Escribano-Bailón, M.T. (2013).** A comparative study to distinguish the vineyard of origin by NIRS using entire grapes, skins and seeds. *J. Sci. Food Agric.* *93*, 967–972.
- Florenzano, G. (1950).** Due nuove specie di lieviti asporigeni, isolati da vini. *Ricerca Scientifica* *20*, 1494–1498.
- Florenzano, G. (1951).** Diffusione e significato enologico dei lieviti *Brettanomyces*. *Atti Accad. Ital. Vite. Vino* *3*, 236–249.
- Fournier, T., Gounot, J.-S., Freel, K., Cruaud, C., Lemainque, A., Aury, J.-M., Wincker, P., Schacherer, J., and Friedrich, A. (2017).** High-Quality de Novo Genome Assembly of the *Dekkera bruxellensis* Yeast Using Nanopore MinION Sequencing. *G3 (Bethesda)* *7*, 3243–3250.
- Fugelsang, K.C. (1997).** *Wine microbiology* (New York: Chapman & Hall).
- Fugelsang, K.C. (1998).** *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins ? *Biofutur* *1998*, 22–23.
- Fugelsang, K.C., and Edwards, C.G. (2007).** *Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures - 2nd edition* (Springer US).
- Fugelsang, K.C., and Zoecklein, B.W. (2003).** Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am J Enol Vitic.* *54*, 294–300.
- Fugelsang, K.C., Osborn, M.M., and Muller, C.J. (1993).** *Brettanomyces* et *Dekkera*. Implications in winemaking. In *Beer and Wine Production: Analysis, Characterization and Technological Advances.*, B.H. Gump, ed. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 110–131.
- Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piškur, J., and Compagno, C. (2011).** *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* *38*, 1079–1088.
- Galafassi, S., Capusoni, C., Muktaduzzaman, M., and Compagno, C. (2013).** Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *J Ind Microbiol Biotechnol* *40*, 297–303.
- Galafassi, S., Toscano, M., Vigentini, I., Zambelli, P., Simonetti, P., Foschino, R., and Compagno, C. (2015).** Cold exposure affects carbohydrates and lipid metabolism, and induces Hog1p phosphorylation in *Dekkera bruxellensis* strain CBS 2499. *Antonie van Leeuwenhoek* *107*, 1145–1153.
- Galzy, P., and Rioux, J.A. (1955).** Observations sur quelques vins atteints par la maladie de “la fleur” dans le midi. *Le Progrès Agricole et Viticole* *144*, 365–370.

- García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., and Simal-Gándara, J. (2007).** Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry* 105, 248–259.
- Garvie, E.I. (1986).** Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual*, (Baltimore, USA: Williams and Wilkins), pp. 1071–1075.
- Gaunt, D.M., Degn, H., and Lloyd, D. (1988).** The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast* 4, 249–255.
- Geana, E.I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O.R., Ionete, R.E., Stefanescu, I., Artem, V., and Bala, C. (2016).** Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistic analysis. *Food Chemistry* 192, 1015–1024.
- Gerbaux, V. (2007).** Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans les vins rouges par cytométrie de flux. *Revue Des Oenologues* 21–24.
- Gerbaux, V., Villa, A., Monamy, C., and Bertrand, A. (1997).** Use of Lysozyme to Inhibit Malolactic Fermentation and to Stabilize Wine After Malolactic Fermentation. *Am J Enol Vitic.* 48, 49–54.
- Gerstein, A.C., McBride, R.M., and Otto, S.P. (2008).** Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Letters* 4, 91–94.
- Gilis, J.-F. (1999).** Étude de contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. PhD Thesis. Toulouse, INPT.
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., and Gidley, M. (2011).** Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry* 125, 823–834.
- Goddard, M.R., and Greig, D. (2015).** *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Res.* 15.
- Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., and Jun, C. (2010).** A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology* 12, 63–73.
- Godoy, L., García, V., Peña, R., Martínez, C., and Ganga, M.A. (2014).** Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage. *Food Control* 45, 81–86.
- González-Arenzana, L., Sevenich, R., Rauh, C., López, R., Knorr, D., and López-Alfaro, I. (2016).** Inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* by High Hydrostatic Pressure technology. *Food Control* 59, 188–195.
- Goode, J., and Harrop, S. (2008).** Wine faults and their prevalence: data from the world's larger blind tasting. 16è Entretiens Scientifiques Lallemand, Horsens.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Zemser, M., and Trakhtenberg, S. (2000).** Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. *Nutrition Research* 20, 131–139.

- Granato, T.M., Romano, D., Vigentini, I., Foschino, R.C., Monti, D., Mamone, G., Ferranti, P., Nitride, C., Iametti, S., Bonomi, F., et al. (2015).** New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *Ann Microbiol* 65, 321–329.
- Gregory, T.R., and Mable, B.K. (2005).** Polyploidy in animals. In *The Evolution of the Genome*, T.R. Gregory, ed. (San Diego, California, USA), pp. 428–501.
- Guerzoni, E., and Marchetti, R. (1987).** Analysis of Yeast Flora Associated with Grape Sour Rot and of the Chemical Disease Markers. *Appl Environ Microbiol* 53, 571–576.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., et al. (2011).** Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11, 591–611.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. (1982).** Flavone and Flavonol Glycosides. In *The Flavonoids*, (Springer, Boston, MA), pp. 261–311.
- Harborne, J., Marby, H., and Marby, T.J. (1975).** *The Flavonoids*.
- Harris, V., Ford, C.M., Jiranek, V., and Grbin, P.R. (2008).** *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 997–1006.
- Harris, V., Jiranek, V., Ford, C.M., and Grbin, P.R. (2010).** Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 721–729.
- Hellborg, L., and Piškur, J. (2009).** Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* 8, 1739–1749.
- Henschke, P. (1996).** Technical notes: *Brettanomyces* in Porto wine. Technical Review of the Australian Wine Research Institute 105, 12–13.
- Heras-Roger, J., Díaz-Romero, C., and Darias-Martín, J. (2016).** A comprehensive study of red wine properties according to variety. *Food Chem* 196, 1224–1231.
- Heredia, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Hernanz, D., Gordillo, B., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., and González-Miret, M.L. (2010).** Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry* 118, 377–383.
- Heresztyn, T. (1986a).** Formation of Substituted Tetrahydropyridines by Species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* Isolated from Mousy Wines. *Am J Enol Vitic.* 37, 127–132.
- Heresztyn, T. (1986b).** Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* 146, 96–98.
- Hocine, B., Jamal, Z., Riquier, L., Lonvaud-Funel, A., and Dols-Lafargue, M. (2010).** Development of a reliable and easy method for screening *Oenococcus* carbohydrate consumption profile. *OENO One* 44, 31–37.

- Hock, S. (1990).** Coping with *Brettanomyces*. *Practical Winery & Vineyard* 10, 26–31.
- Hu, G., Wang, J., Choi, J., Jung, W.H., Liu, I., Litvintseva, A.P., Bicanic, T., Aurora, R., Mitchell, T.G., Perfect, J.R., et al. (2011).** Variation in chromosome copy number influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* and occurs in isolates from AIDS patients. *BMC Genomics* 12, 526.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., and Jimenez, J. (1996).** Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol* 62, 998–1003.
- Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J., and Barkai, N. (2005).** Rewiring of the Yeast Transcriptional Network Through the Evolution of Motif Usage. *Science* 309, 938–940.
- Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisén, S.M., Hagström, Å.K., Rozpędowska, E., Andersen, M.R., Hellborg, L., Ling, Z., Sibirny, A.A., et al. (2016).** Novel Centromeric Loci of the Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. *PLOS ONE* 11, e0161741.
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J.M., Torija, M.J., and Mas, A. (2008).** Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *International Journal of Food Microbiology* 128, 336–341.
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., and Bisson, L.F. (2007).** Adhesion and Biofilm Production by Wine Isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am J Enol Vitic.* 58, 373–378.
- Joseph, C.M.L., Gorton, L.W., Ebeler, S.E., and Bisson, L.F. (2013).** Production of Volatile Compounds by Wine Strains of *Brettanomyces bruxellensis* Grown in the Presence of Different Precursor Substrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 231–240.
- Joseph, C.M.L., Albino, E.A., Ebeler, S.E., and Bisson, L.F. (2015).** *Brettanomyces bruxellensis* Aroma-Active Compounds Determined by SPME GC-MS Olfactory Analysis. *Am J Enol Vitic.* 66, 379–387.
- Joseph, C.M.L., Albino, E., and Bisson, L.F. (2017).** Creation and Use of a *Brettanomyces* Aroma Wheel. *Catalyst: Discovery into Practice* catalyst.2016.16003.
- Khoury, M.E. (2014).** Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles. PhD Thesis. Université de Bordeaux.
- Koufopanou, V., Hughes, J., Bell, G., and Burt, A. (2006).** The spatial scale of genetic differentiation in a model organism: the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1941–1946.
- Kumara, H.M.C.S., and Verachtert, H. (1991).** Identification of Lambic Superattenuating Micro-Organisms by the Use of Selective Antibiotics. *Journal of the Institute of Brewing* 97, 181–185.
- Kumara, H.M.C.S., Cort, S.D., and Verachtert, H. (1993).** Localization and Characterization of α -Glucosidase Activity in *Brettanomyces lambicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2352–2358.

Kunkee, R.E., and Eschnauer, H.R. (2003). Wine. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, (Weinheim, Germany: Wiley-VCH), p.

Lachance, M.-A. (2013). The Biodiversity, Ecology, and Biogeography of Ascomycetous Yeasts. In The Ecological Genomics of Fungi, Francisrtin, ed. (John Wiley & Sons, Inc), pp. 355–370.

Lange, H., Bavouzet, J.M., Taillandier, P., and Delorme, C. (1993). Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. Biotechnol Tech 7, 223–228.

Larcher, R., Puecher, C., Rohregger, S., Malacarne, M., and Nicolini, G. (2012). 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol depletion in wine using esterified cellulose. Food Chemistry 132, 2126–2130.

Lathey, K. a., Bramley, B. r., and Francis, I. I. (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. Australian Journal of Grape and Wine Research 16, 189–202.

Laureano, P., D'Antuono, I., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2005). Efeito de diferentes tratamentos de sanificação na população de *Dekkera bruxellensis* isolada da madeira de barricas. Enologia-Revista Da Associação Portuguesa de Enologia 43, 3–8.

Lavee, S., and Nir, G. (1986). Grapes. In Handbook of Fruit Set and Development, (USA: CRC Press Inc. Boca Raton), pp. 167–191.

Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Molecular Ecology 16, 2091–2102.

Leite, F.C.B., Basso, T.O., Pita, W. de B., Gombert, A.K., Simões, D.A., and de Moraes, M.A. (2013). Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. FEMS Yeast Res 13, 34–43.

Licker, J.L., Acree, T.E., and Henick-Kling, T. (1998). What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor? A preliminary investigation. In Chemistry of Wine Flavour, A.L. Waterhouse, and S.E. Ebeler, eds. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 96–115.

Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., and Alexandre, H. (2016a). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. Food Research International 89, 620–630.

Longin, C., Julliat, F., Serpaggi, V., Maupeu, J., Bourbon, G., Rousseaux, S., Guilloux-Benatier, M., and Alexandre, H. (2016b). Evaluation of three *Brettanomyces* qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study. OENO One 50.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 317–331.

Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal of Food Microbiology 86, 23–50.

Loureiro, V., and Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp. In Food Spoilage Microorganisms, C. d. W. Blackburn, ed. (Cambridge, England: Woodhead Publishing), pp. 354–398.

Louw, M., du Toit, M., Alexandre, H., and Divol, B. (2016). Comparative morphological characteristics of three *Brettanomyces bruxellensis* wine strains in the presence/absence of sulfur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 238, 79–88.

Luo, H., Schmid, F., Grbin, P.R., and Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 415–420.

Lynch, M., Sung, W., Morris, K., Coffey, N., Landry, C.R., Dopman, E.B., Dickinson, W.J., Okamoto, K., Kulkarni, S., Hartl, D.L., et al. (2008). A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *PNAS* 105, 9272–9277.

Maarse, H., and Visscher, C.A. (1989). Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data. (Zeist: TNO-CIVO Food analysis institute).

Madsen, M.G., Edwards, N.K., Petersen, M.A., Mokwena, L., Swiegers, J.H., and Arneborg, N. (2016). Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenols of Aged Wine. *Am J Enol Vitic. ajev*.2016.16015.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1–18.

Mansfield, A.K., Zoecklein, B.W., and Whiton, R.S. (2002). Quantification of Glycosidase Activity in Selected Strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am J Enol Vitic.* 53, 303–307.

Marsit, S., Leducq, J.-B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., and Landry, C.R. (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nat Rev Genet advance online publication*.

Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V., and 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.

Mayer, V.W., and Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 231, 177–186.

Mc Govern, P.E. (1996). Vin Extraordinaire. *The Sciences* 36, 27–31.

Medawar, W., Strehaiano, P., and Délia, M.-L. (2003). Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiology* 20, 527–532.

Meroth, C.B., Hammes, W.P., and Hertel, C. (2003). Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7453–7461.

- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000).** The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136–141.
- Miot-Sertier, C., and Lonvaud-Funel, A. (2007).** Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology* 102, 555–562.
- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., and Egli, C.M. (1999).** Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology* 16, 3–14.
- Moktaduzzaman, M., Galafassi, S., Capusoni, C., Vigentini, I., Ling, Z., Piškur, J., and Compagno, C. (2015).** Galactose utilization sheds new light on sugar metabolism in the sequenced strain *Dekkera bruxellensis* CBS 2499. *FEMS Yeast Research* 15, 1–9.
- Morata, A., Vejarano, R., Ridolfi, G., Benito, S., Palomero, F., Uthurry, C., Tesfaye, W., González, C., and Suárez-Lepe, J.A. (2013).** Reduction of 4-ethylphenol production in red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases. *Enzyme and Microbial Technology* 52, 99–104.
- Morneau, A. D., Zuehlke, J. M., and Edwards, C. G. (2011).** Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Letters in Applied Microbiology* 53, 460–465.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., and Dobson, A.D.W. (2004).** The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 97, 647–655.
- Mortimer, R., and Polsinelli, M. (1999).** On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199–204.
- Mulla, W., Zhu, J., and Li, R. (2014).** Yeast: a simple model system to study complex phenomena of aneuploidy. *FEMS Microbiol Rev* 38, 201–212.
- Nagel, C.W., and Wulf, L.W. (1979).** Changes in the Anthocyanins, Flavonoids and Hydroxycinnamic Acid Esters during Fermentation and Aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am J Enol Vitic.* 30, 111–116.
- Nardi, T., Remize, F., and Alexandre, H. (2010).** Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 925–937.
- Nykänen, L., and Suomalainen, H. (1983).** *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages* (Springer, Netherlands).
- Nyström, T. (2003).** Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *Bioessays* 25, 204–211.
- Oelofse, A. (2008).** Investigating the role of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking. PhD Thesis. Stellenbosch University.

- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., and du Toit, M. (2009).** Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology* 26, 377–385.
- Oliver, J.D. (1993).** Formation of viable but nonculturable cells. In *Starvation in Bacteria*, S. Kjelleberg, ed. (New York, USA: Plenum Press), pp. 239–272.
- Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N.L., and Simpson, L.M. (1995).** Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol* 61, 2624–2630.
- Olsen, R.-A., Bunikis, I., Tiukova, I., Holmberg, K., Lötstedt, B., Pettersson, O.V., Passoth, V., Käller, M., and Vezzi, F. (2015).** De novo assembly of *Dekkera bruxellensis*: a multi technology approach using short and long-read sequencing and optical mapping. *GigaScience* 4, 56.
- Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., and González-Sanjosé, M.L. (2012).** Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT - Food Science and Technology* 48, 1–8.
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004).** APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., and Gori, C. (2004).** Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur Food Res Technol* 218, 360–366.
- Passoth, V., Blomqvist, J., and Schnürer, J. (2007).** *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4354–4356.
- Pellerin, P., and Cabanis, J.-C. (1998).** Les glucides et l’oenologie. In *Fondements Scientifiques et Technologiques*, C. Flanzy, ed. (Paris, France: Claude Flanzy), p.
- Pelletier, R., Krasilnikova, M.M., Samadashwily, G.M., Lahue, R., and Mirkin, S.M. (2003).** Replication and Expansion of Trinucleotide Repeats in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1349–1357.
- Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., and Barrio, E. (2002).** Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains. *Genome Res.* 12, 1533–1539.
- Petrova B., Cartwright Z., Edwards C. (2016).** Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *Oeno one* 50(1), 49-56.
- Petrozziello, M., Asproudi, A., Guaita, M., Borsa, D., Motta, S., Panero, L., and Bosso, A. (2014).** Influence of the matrix composition on the volatility and sensory perception of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in model wine solutions. *Food Chemistry* 149, 197–202.
- Peynaud, E., and Domercq, S. (1956).** Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv. Mikrobiol.* 24, 266–280.

- Peynaud, E., and Sapis-Domercq, S. (1970).** Étude de deux cent-cinquante souches de bacilles hétérolactiques isolés de vins A study of two hundred and fifty strains of lactic acid bacteria. *Archiv. Mikrobiol.* 70, 348–360.
- Phister, T.G., and Mills, D.A. (2003).** Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430–7434.
- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006).** How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics* 22, 183–186.
- Piškur, J., Ling, Z., Marcet-Houben, M., Ishchuk, O.P., Aerts, A., LaButti, K., Copeland, A., Lindquist, E., Barry, K., Compagno, C., et al. (2012).** The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *International Journal of Food Microbiology* 157, 202–209.
- Poláková, S., Blume, C., Zárate, J.Á., Mentel, M., Jørck-Ramberg, D., Stenderup, J., and Piškur, J. (2009).** Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *PNAS* 106, 2688–2693.
- Powell, K. (2008).** Grape phylloxera: an overview. In *Root Feeders: An Ecosystem Perspective*, S.N. Johnson, and P.J. Murray, eds. (Wallingford), pp. 96–114.
- Pretorius, I.S. (2000).** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Procházka, E., Poláková, S., Piškur, J., and Sulo, P. (2010).** Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. *FEMS Yeast Research* 10, 545–557.
- Qiu, Y. (2015).** Phénomènes de transfert d’oxygène à travers la barrique. PhD Thesis. Université de Bordeaux.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., and Shinoda, S. (2014).** Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front. Public Health* 2.
- Ramsey, J., and Schemske, and D.W. (1998).** Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 467–501.
- Rawsthorne, H., and Phister, T.G. (2009).** Detection of viable *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices using ethidium monoazide bromide and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 246–250.
- Reis, A.L.S., de Fátima Rodrigues de Souza, R., Baptista Torres, R.R.N., Leite, F.C.B., Paiva, P.M.G., Vidal, E.E., and de Moraes, M.A. (2014).** Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. Springerplus 3.
- Renouf, V. (2006).** Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l’élaboration du vin : interactions et équilibres, relations avec la qualité du vin. PhD Thesis. Toulouse, INPT.

- Renouf, V., and Lonvaud-Funel, A. (2007).** Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research* 162, 154–167.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., de Revel, G., and 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., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2007).** Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 149–164.
- Renouf, V., Miot-Sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., and Lonvaud-Funel, A. (2009).** Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *International Journal of Wine Research*.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (1999).** Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4003–4008.
- Ribéreau-Gayon, P. (1971).** Les arômes des vins et des eaux de vie. Leur formation et leur évolution. *Bull. O.I.V.* 483, 428–466.
- Ribéreau-Gayon, J., and Peynaud, E. (1951).** Analyse et contrôle des vins.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., and Sudraud, P. (1977).** *Traité D’oenologie - Sciences et techniques du vin - Tome 4 - Clarification et stabilisation, matériels et installations* (Paris, France).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2012a).** *Traité d’oenologie - Tome 1 - Microbiologie du vin, Vinifications* (Dunod).
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2012b).** *Traité d’oenologie - Tome 2 - Chimie du Vin, Stabilisation et traitements* (Dunod).
- Richards, K.D., Goddard, M.R., and Gardner, R.C. (2009).** A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 96, 355–359.
- de las Rivas, B., Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., and Muñoz, R. (2009).** Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 57, 490–494.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2001).** Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* 90, 588–599.
- Romano, P., and Suzzi, G. (1993).** Sulphur dioxide and wine microorganisms. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, G. Fleet, ed. (Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers GmBH), p.

- Romano, A., Perello, M. c., de Revel, G., and Lonvaud-Funel, A. (2008).** Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1577–1585.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., and Capece, A. (2003).** Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169–180.
- Rosenberg, N.A., Pritchard, J.K., Weber, J.L., Cann, H.M., Kidd, K.K., Zhivotovsky, L.A., and Feldman, M.W. (2002).** Genetic Structure of Human Populations. *Science* 298, 2381–2385.
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., and Piškur, J. (2011).** Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* 2, 302.
- Salma, M., Rousseaux, S., Grand, A.S.-L., Divol, B., and Alexandre, H. (2013).** Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* 8, e77600.
- Schanderl, H., and Draczynski, M. (1952).** *Brettanomyces*, eine lästige hefegattung im flashenvergorenen schaumwein. *Wein Und Rebe* 20, 462.
- Scheffers, W.A. (1961).** On the inhibition of alcoholic fermentation in *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. *Experientia* 17, 40–42.
- Scheffers, W.A. (1966).** Stimulation of Fermentation in Yeasts by Acetoin and Oxygen. *Nature* 210, 533–534.
- Schlötterer, C. (2001).** Genealogical inference of closely related species based on microsatellites. *Genet. Res.* 78, 209–212.
- Schopp, L.M., Lee, J., Osborne, J.P., Chescheir, S.C., and Edwards, C.G. (2013).** Metabolism of Nonesterified and Esterified Hydroxycinnamic Acids in Red Wines by *Brettanomyces bruxellensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 11610–11617.
- Schuelke, M. (2000).** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18, nbt0200_233.
- Schuller, D., and Casal, M. (2007).** The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 137–150.
- Serpaggi, V. (2011).** Etude et caractérisation de l'état " Viable mais Non Cultivable " chez *Brettanomyces*, une levure d'altération des vins : nouvel outil de détection et de quantification spécifique de *Brettanomyces* en vin. PhD Thesis. Université de Bourgogne.
- Serpaggi, V., Remize, F., Grand, A.S.-L., and Alexandre, H. (2010).** Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry* 77A, 497–499.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012).** Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology* 30, 438–447.

- Shehata, A., and Mrak, E.M. (1951).** The American Naturalist.
- Shung-Chang, J., Lee, F.L., and Bengston, L. (1985).** Direct evidence of relationship between *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Mycotaxon* 23, 271–273.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., and Azeredo, J. (2012).** *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 288–305.
- Singleton, V.L. (1995).** Maturation of Wines and Spirits: Comparisons, Facts, and Hypotheses. *Am J Enol Vitic.* 46, 98–115.
- Sionov, E., Chang, Y.C., Garraffo, H.M., and Kwon-Chung, K.J. (2009).** Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2804–2815.
- Siverio, J.M. (2002).** Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 277–284.
- Smith, M.T. (1998a).** *Brettanomyces* Kufferath and van Laer. In *The Yeasts*, C.P. Kurtzman, and J.W. Fell, eds. (New York, USA: Elsevier), pp. 450–453.
- Smith, M.T. (1998b).** *Dekkera* van der Walt. In *The Yeasts*, C.P. Kurtzman, and J.W. Fell, eds. (New York, USA: Elsevier), pp. 174–177.
- Smith, B.D., and Divol, B. (2016).** *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology*.
- Smith, C.J., and Osborn, A.M. (2009).** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67, 6–20.
- Smith, M.T., and Grinsven, A.M. van (1984).** *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 143–148.
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R., and Bowyer, P.K. (2006).** Mousy Off-Flavor: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6465–6474.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Verstrepen, K.J. (2015).** *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 206, 24–38.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O’Keefe, H., Sage, A., Young, B., and Coull, J. (2001).** Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from Wine by Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938–941.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., and Calderón, F. (2007).** The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 102, 10–21.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., and Kleinhans, D. (2016).** Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecol Evol* 6, 3461–3475.

Swaffield, C.H., Scott, J.A., and Jarvis, B. (1997). Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats. *Food Microbiology* 14, 353–361.

Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., Brandam, C. (2015). Effect of fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *J Appl Microbiol* 118, 123-131.

Teixeira, R., Dopico-García, S., Andrade, P.B., Valentão, P., López-Vilariño, J.M., González-Rodríguez, V., Cela-Pérez, C., and Silva, L.R. (2015). Volatile phenols depletion in red wine using molecular imprinted polymers. *J Food Sci Technol* 52, 7735–7746.

Tempère, S., Cuzange, E., Schaaper, M.H., de Lescar, R., de Revel, G., and Sicard, G. (2014). “Brett character” in wine: Is there a consensus among professional assessors? A perceptual and conceptual approach. *Food Quality and Preference* 34, 29–36.

Tempère, S., Schaaper, M.H., Cuzange, E., de Lescar, R., de Revel, G., and Sicard, G. (2016). The olfactory masking effect of ethylphenols: Characterization and elucidation of its origin. *Food Quality and Preference* 50, 135–144.

Teoh, A.L., Heard, G., and Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 95, 119–126.

Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., and Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237–243.

Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P., and Benner, S.A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet* 37, 630–635.

Tiukova, I.A., Petterson, M.E., Tellgren-Roth, C., Bunikis, I., Eberhard, T., Pettersson, O.V., and Passoth, V. (2013). Transcriptome of the Alternative Ethanol Production Strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in Sugar Limited, Low Oxygen Cultivation. *PLOS ONE* 8, e58455.

Triquet-Pissard, R. (1979). Etude des polyols et acides fixes du vin par chromatographie en phase gazeuse. PhD Thesis. Université de Bordeaux II.

Ugarte, P., Agosin, E., Bordeu, E., and Villalobos, J.I. (2005). Reduction of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol Concentration in Red Wines Using Reverse Osmosis and Adsorption. *Am J Enol Vitic.* 56, 30–36.

Valdes, J., Tapia, P., Cepeda, V., Varela, J., Godoy, L., Cubillos, F.A., Silva, E., Martinez, C., and Ganga, M.A. (2014). Draft genome sequence and transcriptome analysis of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* LAMAP2480 provides insights into genetic diversity, metabolism and survival. *FEMS Microbiol Lett* 361, 104–106.

Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1989). Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Microbiology* 135, 2399–2406.

- Verachtert, H. (1992).** Lambic and gueuze brewing: mixed cultures in action. In European Communities COMETT Programme, Course on Microbial Contaminants, Helsinki, pp. 243–262.
- Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., and Delvaux, F.R. (2004).** Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in Biotechnology* 22, 531–537.
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L., and Munhoz, C. de F. (2016).** Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol* 39, 312–328.
- Viel, A., Legras, J.-L., Nadai, C., Carlot, M., Lombardi, A., Crespan, M., Migliaro, D., Giacomini, A., and Corich, V. (2017).** The Geographic Distribution of *Saccharomyces cerevisiae* Isolates within three Italian Neighboring Winemaking Regions Reveals Strong Differences in Yeast Abundance, Genetic Diversity and Industrial Strain Dissemination. *Front. Microbiol.* 8.
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., and Volonterio, G. (2008).** Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research* 8, 1087–1096.
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Picozzi, C., Imazio, S., Merico, A., Galafassi, S., Piškur, J., and Foschino, R. (2012).** Intraspecific variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome studied by capillary electrophoresis separation of the intron splice site profiles. *International Journal of Food Microbiology* 157, 6–15.
- Vigentini, I., Lucy Joseph, C. m., Picozzi, C., Foschino, R., and Bisson, L.F. (2013).** Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res* 13, 597–608.
- Vorwerk, S., and Forneck, A. (2006).** Reproductive mode of grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Homoptera: Phylloxeridae) in Europe: molecular evidence for predominantly asexual populations and a lack of gene flow between them. *Genome* 49, 678–687.
- van der Walt, J.P. (1964).** *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek* 30, 273–280.
- van der Walt, J.P. (1970).** *Dekkera* van der Walt. In *The Yeasts: A Taxonomic Study*, J. Lodder, ed. (Amsterdam, Netherlands), pp. 157–165.
- van der Walt, J.P., and van Kerken, A.E. (1958).** The wine yeasts of the Cape, Part I. *Antonie Van Leeuwenhoek* 20, 239–252.
- van der Walt, J.P., and van Kerken, A.E. (1959).** The wine yeasts of the Cape. II. The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. *Antonie Van Leeuwenhoek* 25, 145–151.
- van der Walt, J.P., and van Kerken, A.E. (1960).** The wine yeasts of the Cape. *Antonie van Leeuwenhoek* 26, 292–296.
- van der Walt, J.P., and van Kerken, A.E. (1961).** The wine yeast of the cape. *Antonie van Leeuwenhoek* 27, 81–90.

- Whitesides, M.D., and Oliver, J.D. (1997).** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol* 63, 1002–1005.
- Wijsman, M.R., Van Dijken, J.P., van Kleeff, B.H.A., and Scheffers, W.A. (1984).** Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 183–192.
- Wikén, T., Scheffers, W.A., and Verhaar, A.J.M. (1961).** On the existence of a negative pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie Van Leeuwenhoek* 27, 401–433.
- Willenburg, E., and Divol, B. (2012).** Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *International Journal of Food Microbiology* 160, 131–136.
- Woolfit, M., Rozpędowska, E., Piškur, J., and Wolfe, K.H. (2007).** Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* 6, 721–733.
- Wright, J.M., and Parle, J.N. (1974).** *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 17, 273–278.
- Yamamoto, H. (2000).** Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *J. Infect. Chemother.* 6, 112–114.
- Zardetto de Toledo, O., Teixeira, C., Gonzales, C., and Verona, O. (1959).** Preliminary study upon yeast microflora of grape and grape must in the district of S. Paulo (Brasil). *Annals of Microbiology* 9, 22–34.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2008).** Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197–203.
- Zuehlke, J.M., and Edwards, C.G. (2013).** Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. *J. Food Prot.* 76, 2024–2030.

Annexes

ANNEXE 1 : Nombre d'échantillons traités et d'isolats collectés par châteaux et par stades de prélèvement.

FA : Fermentation alcoolique, FML : Fermentation malolactique.

Château	B	C	D	E	F	G	H	Total
FA	-	-	7	14	26	2	-	49
FML	-	-	29	-	-	6	-	35
Elevage	98	65	46	161	281	596	10	1257
Bouteille	-	-	-	27	90	-	-	117
Total	98	65	82	202	397	604	10	1458

Aucun isolat de *B. bruxellensis* n'a été collecté dans les échantillons du château A.

ANNEXE 2 : Informations relatives aux souches utilisées en fonction des expériences de phénotypage.

Substrat	Groupe	Souche	Phénotypage sucres			Phénotypage phénols volatils			Vin
			« Nanofermenteur »	Biolog	Cinétique et préférences	Cinétique milieu modèle	Substrat carboné/éthanol	Température	Influence « Groupe génétique »
Cidre		L14186	■			■			
Kombucha		KOM14106	■						
Vin		L14160	■						
Vin	CBS2499-like	11AVB4	■			■		■	
Vin		13EN11C5	■					■	
Vin		CBS2499	■				■	■	
Vin		L02/E2 AZ	■						
Vin		L0469	■		■				
Vin		L0611	■	■				■	
Vin		L14163	■						
Vin		L14168	■						
Vin		DEN6_12_9	■						
Biere			CBS3025	■	■		■		
Kombucha	L14165-like	KOM1449	■						
Kombucha		KOM1460	■						
Kombucha		KOM1455	■						
Kombucha		KOM14120	■						
Tequila		UWOPS 92-239.3	■						
Vin	AWRI1499-like	13EN11C11	■			■			
Vin		L0424	■	■			■	■	
Vin		AWRI1499	■					■	
Vin		L0516	■						
Vin		L06/034 AZ	■						
Vin		L14156	■						
Vin		L14190	■	■				■	
Vin		LB15109p	■						
Vin		VP 1545	■						
Vin		L0417	■			■			
Biere		L14195	■						
Biere	AWRI1608-like	GSP 1504	■			■			
Biere		GSP 1516	■	■					
Biere		GSP 1518	■						
Vin		AWRI1608	■				■	■	
Vin		CDR 222	■						
Vin		ISA 1700	■						
Vin		L0422	■	■				■	
Vin		L0463	■				■		
Vin		L14173	■						
Vin		L14183	■	■				■	
Vin	YJS 5400	■							
Vin	AWRI1677	■							
Bioethanol		JP258V2013-C7	■						
Bioethanol		JP354V2014-C8	■						
Tequila	CBS5512-like	UWOPS 92-244.4	■						
Tequila		UWOPS 92-255.4	■						
Tequila		UWOPS 92-262.3	■						
Vin	L0308-like	B001-T28 1	■						
Vin		B001S.14.T49 3	■						
			46	8	2	33	3	2	9

ANNEXE 3: Article Avramova *et al.* soumis

***Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution**

Marta Avramova^{1,8,*}, Alice Cibrario¹, Emilien Peltier¹, Monika Coton², Emmanuel Coton², Joseph Schacherer³, Giuseppe Spano⁴, Vittorio Capozzi⁴, Giuseppe Blaiotta⁵, Franck Salin⁶, Marguerite Dols-Lafargue^{1,7}, Paul Grbin⁸, Chris Curtin⁹, Warren Albertin^{1,10}, Isabelle Masneuf-Pomarede^{1,11}

¹Univ. Bordeaux, ISVV, Unité de recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Bordeaux INP, 33140 Villenave d'Ornon, France ²Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France ³Université de Strasbourg, Centre National de la Recherche Scientifique, Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, Unité Mixte de Recherche, 7156, Strasbourg, France ⁴Department of the Science of Agriculture, Food and Environment, University of Foggia, Foggia, Italy ⁵Department of Agricultural Sciences, Division of Vine and Wine Sciences, University of Naples Federico II, Viale Italia - 83100 Avellino (Italy) ⁶INRA, UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes, PlateForme Génomique, 33610 Cestas, France ⁷Bordeaux INP ISVV EA 4577, F-33140 Villenave d'Ornon, France ⁸School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide, PMB 1, Glen Osmond, SA 5064, Australia ⁹Department of Food Science and Technology, Oregon State University, 100 Wiegand Hall, Corvallis, Oregon 97331-6602, USA ¹⁰ENSCBP, Bordeaux INP, 33600 Pessac, France ¹¹Bordeaux Sciences Agro, 33170 Gradignan, France

Status: Submitted

Abstract

Brettanomyces bruxellensis is a unicellular fungus of increasing industrial and scientific interest over the past 15 years. Previous studies revealed high genotypic diversity amongst *B. bruxellensis* strains as well as strain-dependent phenotypic characteristics. Genomic assemblies revealed that some strains harbour triploid genomes and based upon prior genotyping it was inferred that a triploid population was widely dispersed across Australian wine regions. We performed an intraspecific diversity genotypic survey of 1488 *B. bruxellensis* isolates from 29 countries, 5 continents and 9 different fermentation niches. Using microsatellite analysis in combination with different statistical approaches, we demonstrate that the studied population is structured according to ploidy level, substrate of isolation and geographical origin of the strains, underlying the relative importance of each factor. We found that geographical origin has a different contribution to the population structure according to the substrate of origin, suggesting an anthropic influence on the spatial biodiversity of this microorganism of industrial interest. The observed clustering was correlated to variable stress response, as strains from different groups displayed variation in tolerance to the wine preservative sulfur dioxide (SO₂). The potential contribution of the triploid state for adaptation to industrial fermentations and dissemination of the species *B. bruxellensis* is discussed.

Introduction

Grape derived wine is one of the most popular alcoholic beverages and has been produced by humans since ancient times. It is the result of grape juice fermentation by yeasts which consume the fruit sugars and mainly release ethanol and carbon dioxide. Even though microorganisms are an essential part of the winemaking process, they must cope with a very hostile and variable environment, characterised by high initial sugar content and subsequent high ethanol content, low pH, presence of antimicrobial agents and lack of nutrients. Despite these stressful conditions, some opportunistic microorganisms manage to survive and multiply during and after alcoholic fermentation. A striking example is the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* (teleomorph *Dekkera bruxellensis*) that is typically detected during wine aging but also at lower frequency during the early stages of the winemaking process (grapes and must) (Renouf, 2009; Renouf and Lonvaud-Funel, 2007). When it grows in wine, *B. bruxellensis* produces odorant molecules (namely volatile phenols), which are associated with unpleasant aromas described as barnyard, horse sweat, Band-aid® (Chatonnet et al., 1995a, 1992; Heresztyn, 1986). Therefore, the presence of *B. bruxellensis* in wine often provokes rejection by consumers and serious economic losses for winemakers (Wedral et al., 2010).

The wider industrial relevance of this yeast is highlighted by the fact that it is isolated from various fermented beverages and products. For example, *B. bruxellensis* is an essential contributor to the elaboration of some specialty Belgian and American beers, which are the result of complex spontaneous fermentations performed by various genera of bacteria and yeasts (Bokulich et al., 2012; Steensels et al., 2015). Indeed, *B. bruxellensis* was the first microorganism to be patented for its contribution to English 'stock' ales (Claussen, 1904), in 1904. This yeast has also been isolated from other fermented beverages and food like kombucha, kefir, cider, and olives (Coton et al., 2017; Schifferdecker et al., 2014; Steensels et al., 2015). Interestingly, *B. bruxellensis* was reported to be a common contaminant in bioethanol production plants (Passoth et al., 2007; Souza et al., 2012), and under the right conditions can take the place of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains and perform molasses fermentation (Souza et al., 2012).

The recurrent problem of *B. bruxellensis* in wine and its potential use for beer and bioethanol industrial fermentations has led to high and rising interest in this yeast species. Various studies highlighted great phenotypic diversity of *B. bruxellensis* regarding growth capacity (Agnolucci et al., 2009; Barbin et al., 2008; Fugelsang and Zoecklein, 2003; Oelofse et al., 2009; Romano et al., 2008; Vigentini et al., 2008a), sugar metabolism (Conterno et al., 2006; Crauwels et al., 2017, 2015; Galafassi et al., 2011), nitrogen source utilisation (Borneman et al., 2014; Crauwels et al., 2015), volatile phenols production (Agnolucci et al., 2009; Conterno et al., 2006; Crauwels et al., 2017; Di Toro et al., 2015; Martorell et al., 2006; Renouf, 2009; Romano et al., 2008), behaviour in viable but

not cultivable state (Capozzi et al., 2016), and response to abiotic factors like temperature (Barata et al., 2008; Conterno et al., 2006), pH (Blomqvist et al., 2010; Conterno et al., 2006), oxygen availability (Capusoni et al., 2016; Du Toit et al., 2005a; Uscanga et al., 2003) and sulfur dioxide (SO₂) (Agnolucci et al., 2010; Barata et al., 2008; Conterno et al., 2006; Crauwels et al., 2017; C. Curtin et al., 2012a; Vigentini et al., 2013). This phenotypic variation makes it difficult to predict the spoilage potential of *B. bruxellensis* and is therefore a major concern for winemakers. For example, across several studies the concentration of molecular SO₂ (mSO₂) required to stop *B. bruxellensis*' growth ranged from 0.2 to 1.0 mg.L⁻¹ (Curtin et al., 2015). This observed variability was at least partly due to the use of different strains. However, only a few studies have attempted to correlate SO₂ tolerance to a genotypic profile (Conterno et al., 2006; Curtin et al., 2012a). A striking example is a study of 41 *B. bruxellensis* wine isolates from Australia showing that the most common genotype (92% of studied isolates) was correlated with SO₂ tolerance, thus suggesting that SO₂ usage patterns may have created a selective pressure on this population (Curtin et al., 2012a).

Despite several studies that have explored genetic diversity of this species using fingerprinting techniques such as Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), pulsed field electrophoresis (REA-PFGE), and mtDNA restriction analysis (Agnolucci et al., 2009; Campolongo et al., 2010; Conterno et al., 2006; C. Curtin et al., 2012a; C.D. Curtin et al., 2007; Di Toro et al., 2015; Joseph et al., 2013; Martorell et al., 2006; Oelofse et al., 2009; Vigentini et al., 2012), our understanding of the *B. bruxellensis* global population structure and the factors that drive it remains limited. Several studies highlight an important intraspecific diversity of *B. bruxellensis* (Agnolucci et al., 2009; Conterno et al., 2006; C.D. Curtin et al., 2007; Vigentini et al., 2012) which makes the prediction of its occurrence and behaviour in industrial fermentations difficult. Further, recent genetic studies on a limited number of strains (Albertin et al., 2014b; Borneman et al., 2014; C. D. Curtin et al., 2012) have suggested that polyploidy and hybridisation may play a significant role in microevolution of the species, along with plasticity in chromosomal structure due to “untraditional” centromeres (Ishchuk et al., 2016). The role of polyploidy in adaptive changes to suit environment and/or lifestyle has been observed in other organisms (Albertin and Marullo, 2012; Comai, 2005; Selmecki et al., 2015; Wertheimer et al., 2016), notably for *S. cerevisiae* which shares similar fermentation niches to those occupied by *B. bruxellensis*.

To enhance our knowledge of the global *B. bruxellensis* population, here we used a recently developed microsatellite profiling method (Albertin et al., 2014b) to genotype 1488 isolates from various fermentation niches across five continents. Typing based on microsatellite markers is a rapid, reliable and discriminant genotyping approach that has been successfully used to decipher complex population structures (Guichoux et al., 2011; Vieira et al., 2016) and provide insight into

the ploidy-state (Albertin et al., 2014b). The performed research work aimed to determine the population structure of a large *B. bruxellensis* collection and test for a link between the identified subpopulations and their adaptive ability, with a focus on tolerance to sulfur dioxide.

Materials and methods

Yeast strains

B. bruxellensis strains used in this study were collected from different origins: i) from CRB Oenologie collection (Centre de Ressources Biologiques Oenologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, France), ii) sent from other laboratories, and iii) isolated from wines for the purpose of this work. Overall, the collection of *B. bruxellensis* used in this study contained 1488 isolates (Supplementary Table online and available upon request) which were further analysed by genotyping.

Strain isolation from contaminated wines was performed by spreading 100 µL of wine sample on solid YPD medium containing 10 g.L⁻¹ yeast extract (Difco Laboratories, Detroit M1), 10 g.L⁻¹ bactopectone (Difco Laboratories, Detroit M1), 20 g.L⁻¹ D-glucose (Sigma-Aldrich) and 20 g.L⁻¹ agar (Sigma-Aldrich). This medium was supplemented with antibiotics in order to limit the growth of bacteria (5 g.L⁻¹ chloramphenicol Sigma-Aldrich), moulds (7.5 g.L⁻¹ biphenyl, Sigma-Aldrich), and yeast of the *Saccharomyces* genus (50 g.L⁻¹ cycloheximide, Sigma-Aldrich). The samples were then incubated at 30 °C for 5 to 10 days. Ten colonies were then picked randomly and analysed by PCR using the DB1/DB2 primers (Ibeas et al., 1996) (Eurofins MWG Operon, Les Ulis, France) for species identity confirmation (DNA extraction was performed as described below for the microsatellite analysis). Putative *B. bruxellensis* colonies were streaked and grown on selective YPD medium twice consecutively in order to insure the strain purity. Colonies that gave a positive result by PCR DB1/DB2 were stored at -80 °C in 50% YPD/glycerol medium.

Genotyping by microsatellite analysis

DNA extraction

For DNA extraction, strains were grown on YPD solid medium at 30 °C for 5 to 7 days and fresh colonies were lysed in 30 µL of 20 mM NaOH solution heated at 99 °C for 10 minutes using iCycler thermal cycler (Biorad, Hercules, CA, USA).

Microsatellite loci identification and primers design

Twelve pairs of primers were designed on the basis of the *de-novo* genome assembly of the triploid *B. bruxellensis* strain AWRI1499 (C. D. Curtin et al., 2012) as previously described by (Albertin et al., 2014b). Four pairs of primers were added to the eight that were previously described in order

to improve the discriminative power of the test and to insure its robustness (Supplementary Table S-2.1 online and in Appendix).

Microsatellites amplification

In order to reduce the time and cost of analysis, some of the PCR reactions were multiplexed as shown in the T_m column in Supplementary Table S-2.1 online and in Appendix. By this procedure the number of PCR reactions per sample was reduced from 12 to 9.

PCR reactions were performed in a final volume of 15 µL containing 1 µL of DNA extract (extraction performed as described above), 0.05 µM of forward primer, 0.5 µM of reverse primer and labelled primer (or 1 µL in the case of duplex PCR reactions), 1x Taq-&GO (MP Biomedicals, Illkirch, France). The forward primers were tailed on their 5' end with M13 sequence as described by (Schuelke, 2000). Universal M13 primers were labelled with FAM-, HEX-, AT565- (equivalent to PET) or AT550- (equivalent to NED) fluorescent dyes (Eurofins MWG Operon, Les Ulis, France). This method allows labelling of several microsatellite marker primers with the same fluorochrome marked primer (M13) instead of marking each of the 12 forward primers and thus reduces significantly the analysis cost.

Touch-down PCR was carried out using an iCycler thermal cycler (Biorad, Hercules, CA, USA). The program consisted of an initial denaturation step of 1 min at 94 °C followed by 10 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at T_m+10 °C (followed by a 1 °C decrease per cycle until T_m is reached) and 30 s at 72 °C, then 20 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at T_m and 30 s at 72 °C, and a final extension step of 2 min at 72 °C.

Amplicons were first analysed by a microchip electrophoresis system (MultiNA, Shimadzu) and the optimal conditions for PCR amplifications were assessed. Then, the exact sizes of the amplified fragments were determined using the ABI3730 DNA analyser (Applied Biosystems) (a core facility of INRA, UMR Biodiversité Gènes et Ecosystèmes, PlateForme Génomique, 33610 Cestas, France). Prior to the ABI3730 analysis, PCR amplicons were diluted (1800-fold for FAM, 600-fold for HEX, 1200-fold for AT565 and 1800-fold for AT550) and multiplexed in formamide. The LIZ 600 molecular marker (ABI GeneScan 600 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) was diluted 100-fold and added to each multiplex. Before loading, diluted amplicons were heated 4 min at 94 °C. Allele size was recorded manually using GeneMarker Demo software V2.2.0 (SoftGenetics).

Microsatellite data analysis

To investigate the genetic relationships between strains, the microsatellite dataset was analysed using the Poppr package (Kamvar et al., 2014) in R (3.1.3 version, <https://www.r-project.org>). A dendrogram was established using Bruvo's distance (Bruvo et al., 2004) and Neighbour Joining (NJ) clustering (Paradis et al., 2004). Bruvo's distance takes into account the mutational process of

microsatellite loci and is well adapted to populations with mixed ploidy levels and is therefore suitable for the study of the *B. bruxellensis* strain collection used in this work. Supplementary tests were applied to the same dataset in order to confirm the clusters obtained by Neighbour Joining. First, an UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) analysis was compared with NJ. Then, the partition method (Prosperi et al., 2011) was applied in order to confirm the reliability of the nodes obtained by NJ. Also, a principal component analysis (PCA) by the ade4 package in R (<https://www.r-project.org>) was applied to the same dataset and finally, the function 'find.clusters' available in the adegenet R package was used to identify clusters by successive K-means (Jombart, 2008). Further, AMOVA (analysis of molecular variance) was used to assess the relative importance of geographical localisation and substrate origin regarding *B. bruxellensis* genetic diversity. To confirm the results obtained by the AMOVA analysis, the link between genetic divergence and geographic distance was further evaluated by MANTEL test.

Core genotype analysis

Among the 124 alleles included in the initial dataset, 70 were found to be significantly associated with the triploid isolates (χ^2 test, $p < 0.01$) and were excluded to create a new dataset comprising alleles common to all groups and representative of the core genotype (*i.e.* the genotype common to all groups).

For the inference of population structure with this dataset, LEA package was used (Frichot and François, 2015) in combination with the TESS tool to map the geographical cluster assignments of the ancestral populations as defined by Höhna *et al.* (2016) (Höhna et al., 2016). Further, a differentiation test analysis was performed by calculating the fixation index (F_{ST}) for the core diploid genotype.

Sulfite tolerance assessment

The assay was performed in liquid medium containing 6.7 g.L⁻¹ of YNB (Difco™ Yeast Nitrogen Base, Beckton, Dickinson and Company), 2.5 g.L⁻¹ D-glucose, 2.5 g.L⁻¹ D-Fructose, 5% (v/v) ethanol and increasing concentrations of potassium metabisulfite (PMB, K₂S₂O₅) (Thermo Fischer Scientific) in order to obtain 0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg.L⁻¹ mSO₂ final concentrations. For the calculation of mSO₂ it was considered that K₂S₂O₅ corresponds to about 50% of total SO₂ (therefore a solution of 10 g.L⁻¹ K₂S₂O₅ corresponds to approximately 5 g.L⁻¹ total SO₂). In order to deduce the final mSO₂ concentration, the free SO₂ concentration was assessed by aspiration/titration method. Then, the mSO₂ was estimated by taking into account the final pH, temperature and alcohol content of the medium (resource available at <http://www.vignevin-sudouest.com/services-professionnels/formulaires-calcul/so2-actif.php>). Final pH was adjusted to 3.5 with phosphoric acid (1M H₃PO₄) and the four media (corresponding to the 4 different concentrations of SO₂) were filtered separately with 0.22 µm pore filter (Millipore).

Small-scale fermentations were performed in sterile 4 ml spectrophotometer cuvettes containing a sterile magnet stirrer (Dutscher, France). The cells were grown on YPD agar and inoculated into the YNB-based medium without SO₂. After 96 h of pre-culture (the point at which all strains reached stationary phase), the cells were inoculated at OD₆₀₀ 0.1 in a final volume of 3 ml. The inoculated medium was then covered with 300 µL of sterile silicone oil (Sigma-Aldrich) to avoid oxidation of the medium which could favour the free SO₂ consumption. Then, the cuvette was capped with a plastic cap (Dutscher) and sealed with parafilm. A sterile needle was added by piercing the cap to allow CO₂ release. The “nano-fermenters” were then placed in a spectrophotometer cuvettes container box and on a 15 multi-positions magnetic stirrer plate at 25 °C (the final temperature in the “nano-fermenters” was therefore 29 °C due to the stirrer heating). Optical density (OD₆₀₀) was measured every 24h during at least 300h to follow cell population growth until stationary phase was reached.

For each growth curve, the following three parameters were calculated: maximal OD was the maximal OD reached at 600 nm, the lag phase (in hours) was the time between inoculation and the beginning of cell growth (5% maximal OD increase), and finally, the maximal growth rate was calculated (maximal number of division per hour based on the OD measurement divided by time). A non-parametric Kruskal-Wallis test was used at $\alpha=5\%$ to identify the means that were significantly different.

Results

***B. bruxellensis* genotyping analysis and population structure**

The *B. bruxellensis* collection used in this study comprised 1488 isolates from 29 countries and 9 different substrates, the majority of strains (87%) originating from wine (Supplementary Table online and available upon request). The 1488 isolates were genotyped with 12 primer pairs amplifying microsatellite regions, including four new loci in addition to the eight previously published (Albertin et al., 2014b). Characteristics of the different loci and number of alleles are given in Supplementary Table online and available upon request. One locus out of the four additional loci (D1) displayed a high allelic diversity, presenting 18 different alleles. All isolates were shown to be heterozygous for at least one locus. Many isolates were shown to have more than 2 alleles per locus. About half of the isolates had up to 3 alleles per locus (792 isolates) and some had up to 4 and 5 alleles per locus (67 and 1 isolates, respectively). The high number of isolates with up to 3 alleles per locus suggests the existence of triploidy in the studied population. The same observation was reported previously by (Curtin et al., 2012) and (Borneman et al., 2014) who performed *de-novo* sequencing and comparative genomics respectively, highlighting two triploid strains having different triploidisation origins.

The raw data obtained by the microsatellite analysis corresponds to the alleles (*i.e.* the size of the amplified microsatellite sequences) per locus and per strain (Supplementary Table online). This data was further used for the construction of a dendrogram reflecting the genetic proximity between strains (Figure 2.1 A). The method was based on Bruvo's distance and Neighbour Joining (NJ) and was chosen for being reliable and suitable for populations with mixed ploidy levels. The population clusters in 3 main genetic groups (Figure 2.1 A). Additional methods, including complementary tests and Bayesian approaches were applied to verify the reliability of the clustering obtained by NJ (Figure 2.1). The NJ tree showed three main branches that were almost perfectly conserved with UPGMA method (Figure 2.1 A and B). Then, a principal component analysis (PCA) was performed using R ade4 package (Figure 2.1 C). The PCA analysis showed that the three main groups were almost identical to the clusters previously defined. Furthermore, the partition method (Prosperi et al., 2011) was applied on the same dataset. This algorithm identifies monophyletic clusters for which the individuals are more closely related than randomly selected individuals. The reliability of the node is then computed and nodes with reliability higher than 90% are considered (Figure 2.1 D). The partition method also confirmed the three main clusters obtained with NJ as reliable. Finally, clusters were identified using successive K-means (ade4 package, function *'find.clusters'*). This function implements the clustering procedure used in Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) (Jombart et al., 2010), where successive K-means are run with an increasing number of clusters (k), associated with a statistical measure of goodness of fit. This approach identified 3 clusters, once again very similar to those obtained by NJ (Figure 2.1 E). Overall, the five approaches taken together confirmed the reliability of the three main clusters observed in the studied *B. bruxellensis* population.

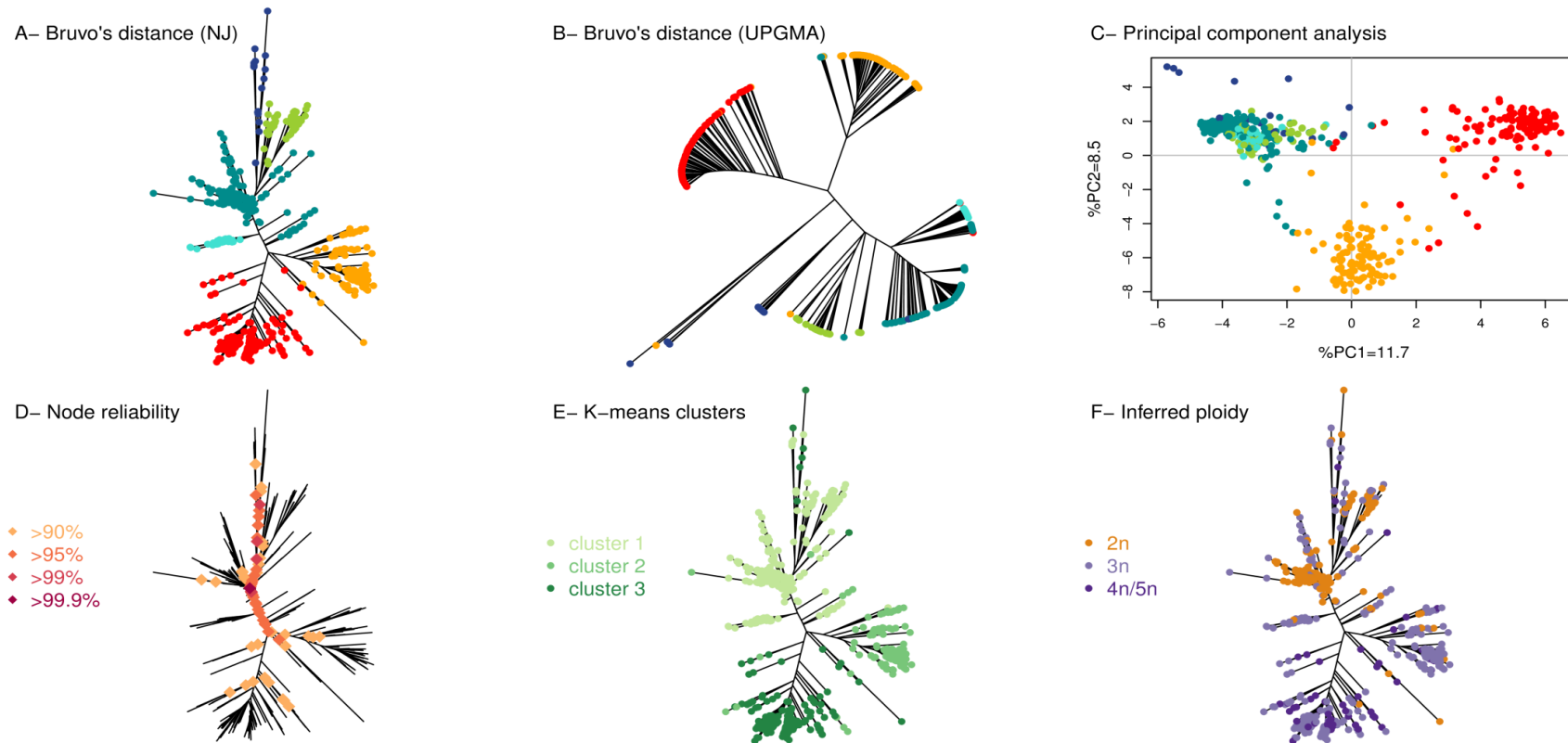


Figure 2.1. *B. bruxellensis* population clusters identification by combining different tools and parameters. A- Dendrogram using Bruvo's distance and NJ clustering. The figure was produced using the *poppr* package in R. B- Dendrogram using Bruvo's distance and UPGMA clustering. The figure was produced using *poppr*. Isolates are shown in the same colours as in A. C- Principal component analysis (PCA) based on microsatellite genotyping. The PCA was computed using the *ade4* package in R. For isolates with incomplete genotyping, the missing data was inferred from the closest neighbour using Bruvo's distance. Isolates are shown with the same colours as in A. D- Node reliability using the partition method (Prosperi et al., 2011). Only the nodes with reliability >90% are shown on the NJ tree. E- Cluster identification using successive K-means. The *find.cluster* function from the *adeget* package in R was applied, using within-groups sum of squares (WSS) statistics and the default criterion *diffNgroup*. This tool identifies an optimal number of 3 clusters, represented on the NJ tree using different arbitrary colours. F- Inferred ploidy. The maximum number of alleles per locus was computed. Isolates with up to 2 alleles/locus were considered as diploid (2n). Isolates with up to 3 alleles/locus were considered as triploid (3n), and the number of loci showing up to 3 alleles was recorded (1-2 loci, or more than 2 loci showing up to three alleles). Finally, isolates with up to 4 or 5 alleles/locus were noted as 4n/5n. The inferred ploidy is represented on the NJ tree.

Since *B. bruxellensis* is known to exhibit different ploidy levels (Borneman et al., 2014; Curtin et al., 2012), we inferred putative ploidy level based on the microsatellite genotyping. Isolates with up to 2 alleles per locus were considered diploid and noted 2n (Figure 2.1 F). Isolates with up to 3 alleles/locus were considered triploid (3n). Finally, isolates with up to 4-5 alleles/locus were noted as 4n/5n. The ploidy level coincided clearly with the three main branches of the dendrogram, the red and orange groups being mostly triploid and the blue-green mostly diploid. Within this last cluster, two triploid sub-groups based on the substrate origin and ploidy level of the strains were defined, marked with blue and cyan colours. Finally, the combination of different methods and factors defined of 3 main groups, the 'diploid' one being further divided into 3 subgroups (Table 2.1 and Figure 2.2).

Table 2.1. Clusters considered as a result of the microsatellite analysis and cluster validation with five different clustering methods

Group name	Number of isolates	Number of genotypes	Putative ploidy (for the majority of the isolates in the group)	Substrate
AWRI1499-like	548	197	Triploid	Mostly from wine
AWRI1608-like	210	127	Triploid	Beer and Wine
CBS 2499-like	573	208	Diploid	Wine
L0308-like	37	26	Triploid	Wine
CBS 5512-like	18	16	Triploid	Bioethanol and tequila
L14165-like	108	58	Diploid	Kombucha

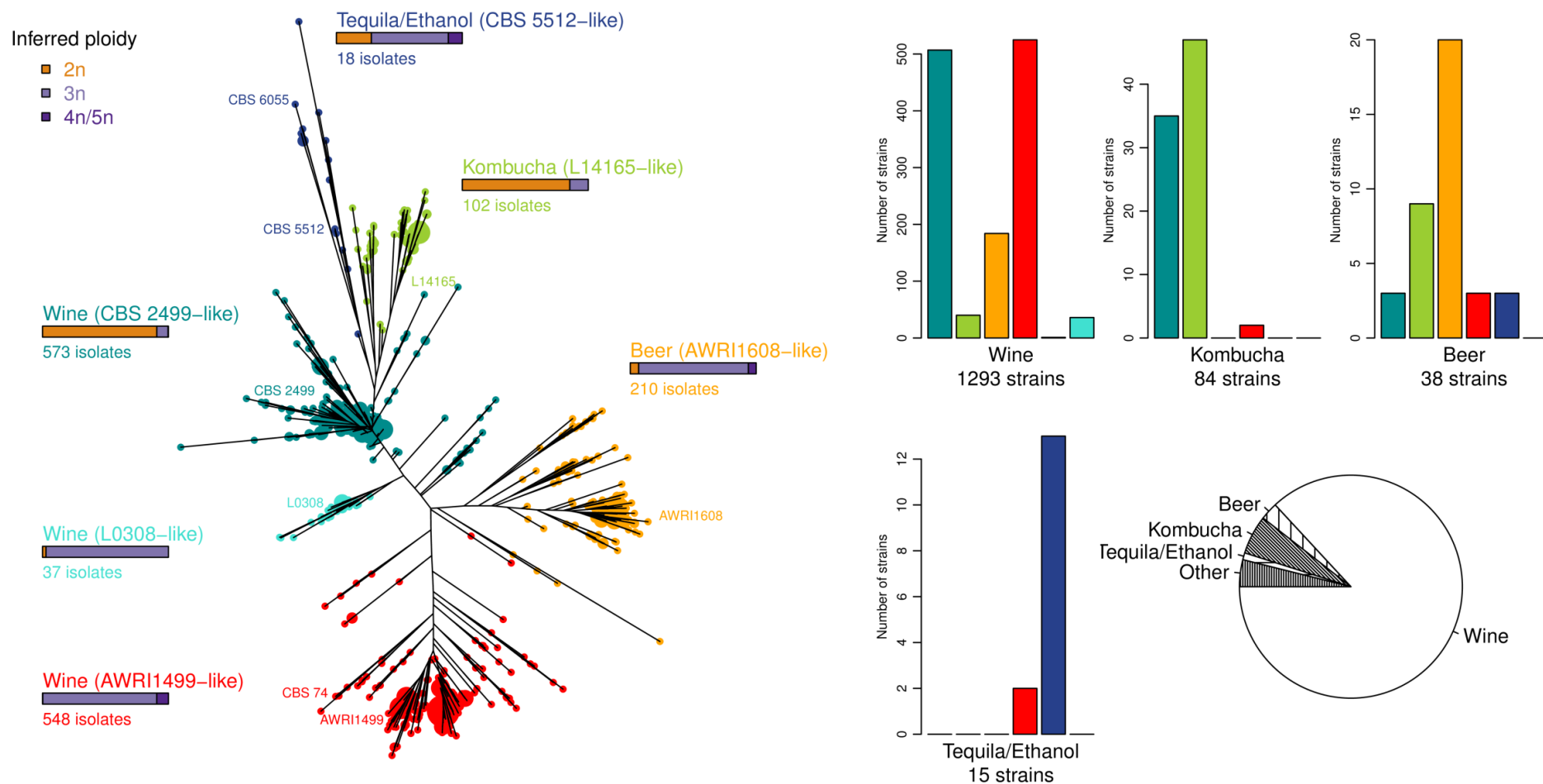


Figure 2.2. Dendrogram of 1488 isolates of *B. bruxellensis* using 12 microsatellite markers. The dendrogram was drawn via the *poppr* package, using Bruvo's distance and NJ clustering. Five clusters were considered and are represented by different colours. Isolates displaying identical genotypes are represented by a unique tip whose size is proportional to the number of isolates. Inferred ploidy was made as described in Figure 2.1 F. The histograms represent the distribution of isolates depending on the substrate and the five considered clusters. The pie chart illustrates the proportion of the strains originating from different types of sources.

To assess the relative importance of geographical localisation, substrate origin and ploidy level on *B. bruxellensis*' population structure, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed. The three factors were shown to be significant (p-value<0.0001). Ploidy level explained 46.9% of the variance, whereas the geographical origin and substrate factors explained only small proportions of the total variation (around 5% for each) (Table 2.2). However, when considering non-wine isolates, the geographical origin explains 54.8% of the total variance, suggesting that wine genotypes are highly disseminated across the regions studied in comparison with other substrates. The correlation between genetic and geographic distance matrix (MANTEL test) was also significant (p-value=0.0009), confirming that the genetic variation of the total population is significantly related to geographical localisation. The MANTEL test, performed only on the wine strains (p-value=0.0040), also confirmed the results obtained with AMOVA, suggesting a different population structure amongst wine strains compared to those from the other niches.

Table 2.2. Impact of geographical localisation, substrate origin and ploidy on the population variance (AMOVA test)

Factor	%Variance	p-value
Country	4.89	<0.0001
Country (wine isolates)	3.7	<0.0001
Country (non-wine isolates)	54.8	<0.0001
Substrate	5.93	<0.0001
Ploidy	46.9	<0.0001

Core genotype analysis

Core diploid data subset

Most classical population genetic analyses cannot be performed using our initial microsatellite dataset since *B. bruxellensis* population include diploid and polyploid isolates, and most traditional analyses are not available for mixed ploidy levels. To overcome such difficulties, we excluded the alleles identified as specific to the isolates showing more than 3 alleles for at least one locus. Among the 124 alleles included in the initial dataset, 70 were found to be significantly associated with the triploid isolates (χ^2 test, p-value<0.01), and were excluded to create a new dataset comprising alleles representative of the core genotype (*i.e.* the genotype common to all groups). This approach is justified as previous comparative genomics studies showed that *B. bruxellensis* isolates shared a core diploid genome (Borneman et al., 2014).

The obtained core genotype dataset showed up to 2 alleles per locus for most individuals (1350 out of 1488) and only 138 remaining individuals had loci with 3 or 4 alleles. This indicates that the

removal of specific triploid alleles allowed us to have access to the core diploid genome common to all *B. bruxellensis* isolates. Loci with more than 2 alleles were considered as missing data and only concerned 138 individuals, of which 130 only had one locus with 3 alleles.

Ancestral populations and inference of population structure

LEA package and the *snmf* function in R were used to infer population structure for the 'core diploid' dataset. The number of ancestral populations tested ranged from $K=1$ to $K=15$ (100 repetitions), and entropy criterion was computed to choose the number of ancestral populations explaining the genotypic data in the best way (Supplementary Figure S-2.1 online and in Appendix). Entropy was minimal for $K=5$ ancestral populations ($K=3, 4, 5, 6$ shown on Supplementary Figure S-2.2 online and in Appendix). Such Bayesian analysis shows that these 5 ancestral populations are congruent with previous analyses that considered the complete dataset (Figure 2.3): the AWRI1499-like (wine, red) and AWRI1608-like (beer, orange) groups were associated with only one ancestral population. Likewise, most of the blue-green subgroups (wine CBS 2499-like, wine L0308-like, kombucha L14165-like) previously defined were associated with only one ancestral population. Finally, only the tequila/ethanol group (CBS 5512-like) seemed to be associated with more than one ancestry. Altogether, the population structure analysis on the core diploid genotype confirmed the previous clustering and suggested the existence of only one ancestral population for each current population.

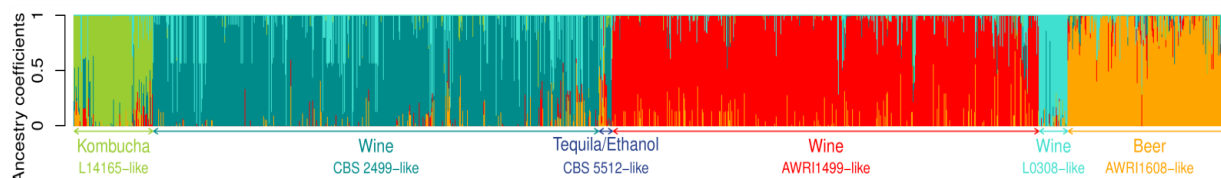


Figure 2.3. Ancestral populations of 1488 *B. bruxellensis* strains. STRUCTURE plots for $K=5$ (the number of ancestral population with lowest entropy, see Supplementary Fig. S1 online). Each bar represents an isolate and the colour of the bar represents the estimated ancestry proportion of each of the K clusters. The same colour code is kept as in Figure 2.1 and 2.2.

Population differentiation analysis

A population differentiation analysis was performed by calculating the fixation index (F_{ST}) on the core diploid genotype dataset (Figure 2.4). The wine AWRI1499-like population is highly differentiated from beer AWRI1608-like and wine CBS 2499-like groups (with F_{ST} 0.36 and 0.39 respectively). This confirms the grouping obtained by the previous analyses. In addition, the pairwise F_{ST} values showed high differentiation between beer AWRI1608-like and wine CBS 2499-like populations (F_{ST} 0.28). The L14165-like kombucha population seems to be mostly

differentiated from the 1608-like beer population and is closer to CBS 5512-like tequila/ethanol group. Finally, it is interesting to point out that the CBS 5512-like group is not highly differentiated from all other groups, which is congruent with the fact that population structure analysis inferred multiple ancestries populations for that group.

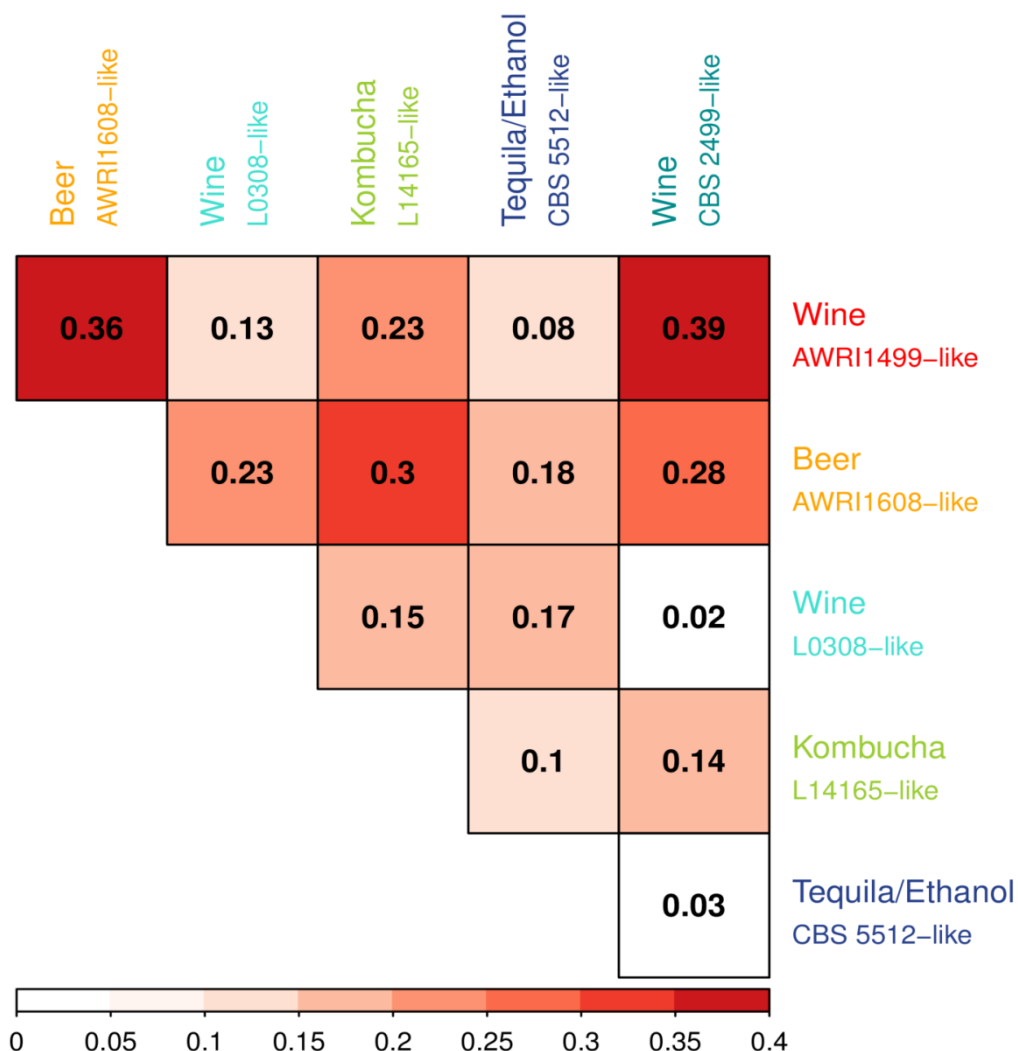


Figure 2.4. Population differentiation represented by fixation index (F_{ST}) of *B. bruxellensis* genetic groups between each other. The range of F_{ST} is from 0 to 1, 1 meaning that the two populations do not share any genetic diversity.

Sulfite tolerance

Sulfur dioxide tolerance was assayed for a subset of *B. bruxellensis* (a total of 39 strains). The chosen strains were selected according to their various geographical origins, substrates and different genetic groups. Some isolates showing identical microsatellite genotypes were included to evaluate possible sulfur tolerance variation between strains with undifferentiated genotypic patterns (13-EN11C11=L0417=L0424; UWOPS 92- 244.4=UWOPS 92- 262.3; L0469=L14186).

Each strain was grown in medium with increasing SO₂ concentration (ranging from 0 to 0.6 mg.L⁻¹ molecular SO₂) in biological triplicates, so that more than 480 fermentations were monitored.

Three growth parameters (lag phase, maximum growth rate, maximal OD) in the presence of four different concentrations of mSO₂ were followed until stationary phase was reached or for a maximum of 300h when growth was slow or absent. The isolates presented different behaviour according to mSO₂ concentration (Figure 2.5). Based on the growth parameters of the strains when exposed to increased concentrations of mSO₂, two main groups were identified: 1) sensitive strains (S) characterised by an altered growth with i) a significant lag phase prolongation, ii) a significant decrease in maximum growth rate, and/or iii) significant decrease in maximum OD₆₀₀ (e.g. the sensitive strain L0422 had a lag phase of 17.2 h, 40.7 h, 255.8 h and growth absence, growth rate values were 0.11, 0.07, 0.02 divisions/h and growth absence for and OD₆₀₀ 2, 1.9, 0.8 and no growth at 0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg.L⁻¹ mSO₂ respectively); 2) tolerant strains (T) that showed unmodified growth rate and maximum OD₆₀₀ but sometimes a significant prolongation of lag phase was observed (e.g. the tolerant strain AWRI1499 had a maximal growth rate of 0.07, 0.09, 0.08 and 0.07 divisions/h, OD₆₀₀ 1.9, 2.0, 1.9 and 1.9, lag phase of 75, 56.5, 91.5 and 110.3 h at 0, 0.2, 0.4 and 0.6 mg.L⁻¹ mSO₂ respectively for the same strain) (mean values of those parameters for each strain are shown in Supplementary Table S-2.4 online in Appendix). A clear relation between genetic group and SO₂ tolerance was highlighted (Figure 2.5). The isolates from groups AWRI1608-like, CBS 5512-like, CBS 2499-like and L14165-like were mostly identified as sensitive (S), whereas the triploid AWRI1499-like and triploid L0308-like groups were mostly classified as tolerant (T). Furthermore, the isolates with an identical microsatellite profile presented similar behaviour in means of growth parameters in the different conditions studied here (Figure 2.5 and Supplementary Table S-2.4 online in Appendix).

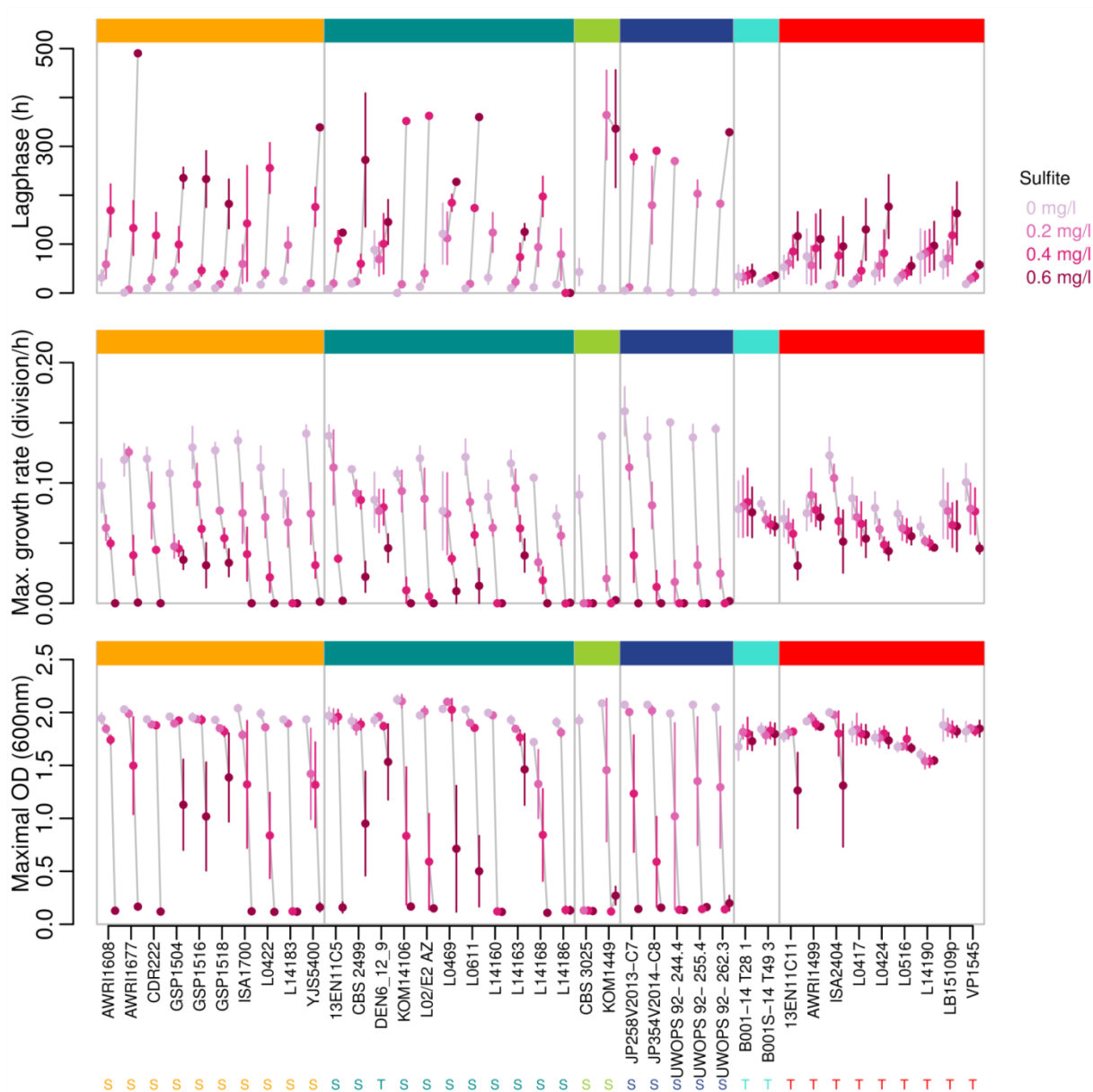


Figure 2.5. Growth parameters of *B. bruxellensis* strains at different concentrations of SO₂. 39 strains belonging to the 6 genetic groups defined previously were tested in small scale fermentations and growth (OD₆₀₀) was measured in media containing different concentrations of sulfur dioxide (0, 0.2, 0.4, and 0.6 mg.L⁻¹ mSO₂) and in biological triplicates. Three parameters were considered: lag phase (h): end of lag phase considered when OD above initial OD*5%; maximal growth rate (r) = number of cellular divisions per hour; maximal OD; S and T stand for sensitive and tolerant (Kruskal-Wallis test, $\alpha=5\%$). Genetic groups are represented in the same colours as on Figure 2.2.

Discussion

The yeast *B. bruxellensis* has gained importance for its impact not only in wine industry, but also in beer- and bioethanol-associated fermentation processes. Subsequently, many independent studies were held and results were obtained on different *B. bruxellensis* collections but without leading to a holistic picture of the *B. bruxellensis* species. In this study, a large collection of *B. bruxellensis* strains (1488 isolates) from various substrates (9, the majority of strains (87%) being isolated from wine) and geographic origins (5 continents) was genotyped. The use of a reliable and robust method (microsatellite analysis) determined a general picture of the species' genetic diversity and population structure. The analysis of the complete genotype dataset highlighted 3 main genetic clusters in the *B. bruxellensis* population represented by the AWRI1499-like group, AWRI1608-like and CBS 2499-like group correlating with ploidy level and substrate of isolation. Three sub-clusters were also defined for their ploidy level and substrate of isolation, namely tequila/ethanol CBS 5512-like group, wine L0308-like, and kombucha L14165-like group. Our results are consistent with comparative genomics analysis showing that the AWRI1499, AWRI1608 and AWRI1613 (genetically close to the strain CBS 2499) strains are genetically distant and that the AWRI1499 and AWRI1608 strains are triploid while AWRI1613 is diploid (Borneman et al., 2014).

Heterozygosity for at least one out of the 12 microsatellite loci was shown for all *B. bruxellensis* isolates. This observation supports the assumption that a simple haploid organisation of the genome is excluded, which is congruent with previous results based on the Southern analysis of single gene probes of 30 *B. bruxellensis* strains from different geographical origins (Hellborg and Piškur, 2009). In comparison, using microsatellite analysis, Legras *et al.* (2007) reported 102 out of 410 *S. cerevisiae* isolates (about 25%) and 75% of *Saccharomyces uvarum* strains (among 108 isolates from various geographical and substrates origins) to be homozygous (Legras et al., 2007). In general, highly homozygous strains are associated with sporulation and selfing phenomena (Mortimer et al., 1994). So, this could suggest that in the case of *B. bruxellensis* these mechanisms are non-existent or very rare amongst isolates from industrial fermentation environments. Indeed, there is only one study to our knowledge (Walt and Kerken, 1960), which reports spore formation for *B. bruxellensis* (and therefore its teleomorph form *Dekkera bruxellensis*). In the scenario of rare or non-existent sexual reproduction, a large proportion of heterozygous strains would promote higher phenotypic diversity and therefore colonisation of new niches and adaptation to new environments (Magwene, 2014).

Our results confirm on a large scale the assumption that the *B. bruxellensis* population is composed of strains with different ploidy level (Albertin et al., 2014b; Borneman et al., 2014; Curtin et al., 2012; Hellborg and Piškur, 2009), as 57.8% of the isolates were shown to have more than 2 alleles

for at least one locus. Moreover, polyploid strains were associated with various fermentation niches and geographical regions. A strong correlation between genetic clustering and ploidy level was highlighted, with some clusters predicted to be diploid (CBS 2499-like) while others were composed of mainly triploid isolates (e.g. AWRI1499- and AWRI1608-like). The latter two clusters derive from distinct ancestral populations and thus, presumably from different triploidisation events. The polyploid state typically has a high fitness cost on the eukaryote cell due to the difficulty to maintain imbalanced number of chromosomes during cell division as well as other effects caused by nucleus and cell enlargement (Comai, 2005). Thus, it is presumed that a stable polyploid or aneuploid state is maintained when it confers advantage for the survival of the cell in particular conditions (Wertheimer et al., 2016). Indeed, aneuploidy and polyploidy contribute to genome plasticity and have been shown to confer selective and fitness advantages to fungi in extreme conditions, such as the presence of high concentrations of drugs, high osmotic pressure, low temperature, and others (see Albertin and Marullo, 2012; Mulla et al., 2014; Wertheimer et al., 2016 for review). Similar observations have been made in clinical microbiology, for example, 70% of 132 completely sequenced *S. cerevisiae* clinical isolates with different geographic origins were shown to be poly- or aneuploid (Zhu et al., 2016). It has been suggested that the aneuploid state contributes to the transition from commercial (industrial fermentations) to clinical (human pathogen lifestyle) environments. Aneuploidy was also reported for another human pathogen – *C. albicans*, for which an aneuploidy of an isochromosome [i(5L)] is shown to confer resistance to fluconazole (Selmecki et al., 2006). In the industry, stable autotetraploid *S. cerevisiae* strains have been described among isolates from a bakery environment and it was suggested that their prevalence in sour dough fermentation could be the result of human selection for tolerance to high osmotic pressure and high metabolic flux – highly favourable characteristics for baking (Albertin et al., 2009). In the case of *B. bruxellensis*, however, polyploidy seems to be not only due to a “simple” duplication of chromosomes and/or regions of chromosomes but is the result of independent hybridisation events with closely or distantly related unknown species (Borneman et al., 2014), which result in allotriploid strains. Efficient hybrid species are not rare in human related fermentations (Albertin and Marullo, 2012; Querol and Bond, 2009; Steensels et al., 2014) and often the hybridisation with a genetically close species is believed to confer tolerance to specific stress factor in a given environment. This is the case of *S. pastorianus*, used for lager beer fermentations characterised with low temperatures. This yeast has recently been shown to be a hybrid between *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* – a cryotolerant species isolated from forests in Patagonia (Libkind et al., 2011), Tibet (Bing et al., 2014) and recently from New Zealand (Gayevskiy and Goddard, 2016). Thus, presumably sterile hybrids were naturally generated and they multiplied clonally, accumulating mutations which enhanced the adaptability of the new “species” (Libkind et al., 2011). Hybrids are also a widespread state among wine yeast, where

natural or laboratory obtained combinations between two species could have interesting technological properties (Le Jeune et al., 2007; Masneuf et al., 1998; Naumov et al., 2000; Sipiczki, 2008; Steensels et al., 2014). Other form of genome dynamics was also highlighted for the diploid CBS 2499 strain possessing specific centromeric loci configuration that enables genome rearrangements and ploidy shifts (Ishchuk et al., 2016). Based on the body of knowledge concerning other polyploid micro- and macro-organisms and the prevalence of polyploid strains highlighted in this study, we assume that *B. bruxellensis* has adapted to environmental stress factors by the means of genome plasticity, namely polyploidy.

Our study showed that at least one group, the AWRI1499-like triploid wine group, is composed of wine isolates that are highly tolerant to SO₂ and that are clearly divergent from other *B. bruxellensis* clusters (F_{ST} higher than 0.35 when compared with AWRI1608-like and CBS 2499-like groups). Nevertheless, for some wine samples, isolates from both AWRI1499-like triploid group and the CBS 2499-like diploid group were identified. Coexistence of diploid and polyploid (auto- and allopolyploid) “microspecies” has often been reported for plants, in which the polyploids are widely distributed as opposed to the diploids that have a more restricted distribution (Stebbins, 1940). Babcock and Stebbins were the first to name this coexistence of populations a diploid-polyploid complex (Babcock et al., 1938) for a *Crepis* species defined as a group of interrelated and interbreeding species that also have different levels of ploidy. These authors claimed that such polyploid complex can arise when there are at least two genetically isolated diploid populations and auto- and allopolyploid derivatives that coexist and interbreed. In the case of *B. bruxellensis*, the sexual cycle of this yeast is not yet elucidated and interbreeding remains to be evidenced. However, we propose that *B. bruxellensis* could be described as a diploid-triploid complex, in which sub-populations with different ploidy levels coexist.

To obtain a deeper understanding of the factors shaping *B. bruxellensis* population structure, we explored the impact of geographical localisation and industrial fermentation environment of origin on the total genetic variance. Contribution of the “geographic origin” factor to the population structure was shown to be significant yet only explained a relatively small proportion of variation. However, the variance proportion explained by this factor is much higher when considering non-wine isolates, suggesting that wine strains are highly dispersed worldwide. This dispersal could easily reflect exchange of material and human transport associated with winemaking, followed by adaptation to local winemaking practices (Curtin et al., 2007). Exchange of material also happens between different industries, which would facilitate local transfer of microorganisms between beverages. For example, some beers are aged in oak barrels previously used for winemaking (Sanna and Pretti, 2015). Also, in the past, beer fermentation is thought to have been initiated by the addition of a small amount of wine (Mortimer, 2000b). Such exchanges

could be a possible explanation for the low (but significant) contribution of the “substrate of isolation” factor to the total genetic variance in the studied population (5.93%, p -value <0.0001). Substrate of isolation and geographic origin contributed to a similar extent to the total genetic variance of the population. However, this percentage remained low (5%) compared to *S. cerevisiae* for which geographic origin was shown to contribute to 28% of the genetic variance (Legras et al., 2007), and *Candida albicans* for which 39% were reported (Fundyga et al., 2002). For *S. cerevisiae*, a significant contribution of geographic origin to the genetic variance is often perceived as a sign of local domestication (Almeida et al., 2015; Legras et al., 2007). Like *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* is isolated from human-conducted fermentations including beer and wine. However, until now there are no *B. bruxellensis* isolates from “natural” non-human related habitats contrary to the case of *S. cerevisiae* (Sampaio and Gonçalves, 2008; Sniegowski et al., 2002; Wang et al., 2012). A recent comparative study of strains with different industrial origins and their growth capacities in various type of media (wine, beer, and soft drink) suggests adaptation of *B. bruxellensis* strains to different fermented beverages (Crauwels et al., 2017). In our study, a low but significant contribution of substrate of isolation to the total genetic variance of the species was highlighted (5.93 %, p -value <0.0001), which is an indicator for the adaptation of certain sub-groups to different human-related niches (e.g. winemaking conditions, kombucha fermentation, and others). This structuration is further accompanied by a specific genetic configuration, some groups being mostly diploid and others polyploid.

The hypothesis that the triploid state of *B. bruxellensis* is maintained for some genetic groups because of its contribution to adaptation to a certain type of environment or stress factors is strongly supported by the sulfite tolerance assay performed in our study. This indicated that strains representative of the globally dispersed wine triploid AWRI1499-like group are highly tolerant to SO₂. Sulfur dioxide is the most common antimicrobial agent used in winemaking. However, very tolerant *B. bruxellensis* strains have been reported (Curtin et al., 2015). Particularly, in Australia 92% of the isolates are genetically close to a strain that has been shown to be triploid by genome sequencing and highly tolerant to SO₂ (normal growth at more than 0.6 mg.L⁻¹ mSO₂)(Curtin et al., 2012a). Here, we show that isolates from this genetic group are highly represented worldwide, namely in France, Italy, Portugal, Southern Argentina and Chile. Furthermore, we confirmed on a larger scale (39 strains from different geographical and fermentation niches) that even high SO₂ doses could not guarantee the absence of growth of these strains and therefore their potential to spoil wine. In this context, it is worth noting that isolates from substrates other than wine, were all sensitive to SO₂ which suggests a direct link between SO₂ exposure in wine and tolerance to this compound. Survival in the presence of SO₂ has been broadly studied in *S. cerevisiae* but is still not fully elucidated. SO₂ is a small and reactive molecule that could enter the cell passively or *via* selective transport (Divol et al., 2012). Once inside the

cell, SO₂ can interact with different enzymes and molecules thus having an impact on the basic metabolic pathways of the cell, such as glycolysis. Strategies to tolerate SO₂ are also numerous, like its action on the cell: through the production of molecules that bind SO₂ (acetaldehyde, pyruvate, and others), SO₂ oxidation and SO₂ active efflux by sulfite pump (*SSU1*) (Divol et al., 2012). Even if in *B. bruxellensis* these mechanisms are not elucidated, SO₂ tolerance could be linked to different aspects – presence of gene(s) coding for a sulfite transporter or presence of this gene (or genes) in multiple copies and therefore overexpression, differences in the gene regulation leading to more efficient response to SO₂ toxicity, or morphological and physiological state of the cell that would give it the ability to tolerate this antimicrobial agent (cell membrane structure, growth, etc.). The fact that all the highly tolerant *B. bruxellensis* strains are triploid indicates that this genetic configuration could contribute to SO₂ tolerance. As mentioned in the previous paragraphs, polyploid states are maintained when they confer a selective advantage. In this case, we can hypothesise that the allotriploid AWRI1499-like strains combine genetic and physiological characteristics from the parent genomes that confer to them the ability to survive in the presence of SO₂.

A possible strategy to cope with the issue of highly tolerant strains would be the increase of SO₂ concentration added to the must and wine. However, the strong legislation and consumer pressure to reduce any kind of wine additives makes it undesirable to produce wines with high concentrations of SO₂ which would be needed for the prevention of AWRI1499-like strains growth. Therefore, the genetic content of *B. bruxellensis* has to be considered when choosing spoilage prevention and treatment methods in the winery in order to obtain optimal effect with minimum intervention. Overall, our results show that polyploid strains are widely disseminated and suggest that *B. bruxellensis* is a diploid-triploid complex whose population structure has been influenced by the use of sulfur dioxide as a preservative in winemaking. Thus, we highlight the importance of *B. bruxellensis* species as a non-conventional model microorganism for the study of polyploidy as an adaptation mechanism to human-related environments.

Data availability

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Renouf, V. & Lonvaud-Funel, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167 (2007).
2. Renouf, V. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *Int. J. Wine Res.* 95 (2009). doi:10.2147/IJWR.S4612
3. Chatonnet, P., Dubourdieu, D. & Boidron, J. N. The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463–468 (1995).
4. Chatonnet, P., Dubourdieu, D. & Boidron, J. N. Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci. Aliments* 12, 665–685 (1992).
5. Heresztyn, T. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* 146, 96–98 (1986).
6. Wedral, D., Shewfelt, R. & Frank, J. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479 (2010).
7. Steensels, J. et al. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38 (2015).
8. Bokulich, N. A., Bamforth, C. W. & Mills, D. A. Brewhouse-Resident Microbiota Are Responsible for Multi-Stage Fermentation of American Coolship Ale. *PLOS ONE* 7, e35507 (2012).
9. Claussen, N. H. On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *J. Inst. Brew.* 10, 308–331 (1904).
10. Schifferdecker, A. J., Dashko, S., Ishchuk, O. P. & Piškur, J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast Chichester Engl.* 31, 323–332 (2014).
11. Coton, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, (2017).
12. Passoth, V., Blomqvist, J. & Schnürer, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4354–4356 (2007).
13. Souza, R. B. de et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1645–1650 (2012).
14. Agnolucci, M. et al. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 238–244 (2009).
15. Barbin, P., Cheval, J.-L., Gilis, J.-F., Strehaiano, P. & Taillandier, P. Diversity in spoilage yeast *dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isolated from French red wine. Assessment during fermentation of synthetic wine medium. *J. Inst. Brew.* 114, 69–75 (2008).
16. Fugelsang, K. C. & Zoecklein, B. W. Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 294–300 (2003).
17. Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A. & du Toit, M. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol.* 26, 377–385 (2009).
18. Romano, A., Perello, M. c., Revel, G. de & Lonvaud-Funel, A. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577–1585 (2008).

19. Vigentini, I. et al. Physiological and oenological traits of different Dekkera/*Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096 (2008).
20. Conterno, L., Joseph, C. M. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T. & Bisson, L. F. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147 (2006).
21. Crauwels, S. et al. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9123–9134 (2015).
22. Galafassi, S. et al. Dekkera/*Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1079–1088 (2011).
23. Crauwels, S. et al. Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *FEMS Yeast Res.* 17, (2017).
24. Borneman, A. R., Zeppel, R., Chambers, P. J. & Curtin, C. D. Insights into the Dekkera bruxellensis Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLoS Genet.* 10, (2014).
25. Di Toro, M. R. et al. Intraspecific biodiversity and ‘spoilage potential’ of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 102–108 (2015).
26. Martorell, P. et al. Molecular typing of the yeast species Dekkera bruxellensis and Pichia guilliermondii recovered from wine related sources. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 79–84 (2006).
27. Capozzi, V. et al. Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* 59, 196–204 (2016).
28. Barata, A. et al. Survival patterns of Dekkera bruxellensis in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 201–207 (2008).
29. Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J. & Passoth, V. Fermentation characteristics of Dekkera bruxellensis strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1487–1497 (2010).
30. Capusoni, C. et al. Effects of oxygen availability on acetic acid tolerance and intracellular pH in Dekkera bruxellensis. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00515-16 (2016). doi:10.1128/AEM.00515-16
31. Du Toit, W. j., Pretorius, I. s. & Lonvaud-Funel, A. 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. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871 (2005).
32. Uscanga, M. G. A., Délia, M.-L. & Strehaiano, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 157–162 (2003).
33. Agnolucci, M. et al. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 76–80 (2010).
34. Curtin, C., Kennedy, E. & Henschke, P. A. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian Dekkera (*Brettanomyces*) bruxellensis wine isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61 (2012).
35. Vigentini, I., Joseph, C. M. L., Picozzi, C., Foschino, R. & Bisson, L. F. Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res.* 13, 597–608 (2013).
36. Curtin, C., Varela, C. & Borneman, A. Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 680–692 (2015).

37. Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V. & Cocolin, L. Prevalence and Biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine from Northwestern Italy. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 486–491 (2010).
38. Curtin, C. D., Bellon, J. R., Henschke, P. A., Godden, P. W. & De, B. L. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* 7, 471–481 (2007).
39. Joseph, C. M. L., Gorton, L. W., Ebeler, S. E. & Bisson, L. F. Production of Volatile Compounds by Wine Strains of *Brettanomyces bruxellensis* Grown in the Presence of Different Precursor Substrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 231–240 (2013).
40. Vigentini, I. et al. Intraspecific variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome studied by capillary electrophoresis separation of the intron splice site profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 6–15 (2012).
41. Curtin, C. D., Borneman, A. R., Chambers, P. J. & Pretorius, I. S. De-Novo Assembly and Analysis of the Heterozygous Triploid Genome of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. *PLOS ONE* 7, e33840 (2012).
42. Albertin, W. et al. Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol.* 42, 188–195 (2014).
43. Ishchuk, O. P. et al. Novel Centromeric Loci of the Wine and Beer Yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. *PLOS ONE* 11, e0161741 (2016).
44. Albertin, W. & Marullo, P. Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proc. Biol. Sci.* 279, 2497–2509 (2012).
45. Comai, L. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846 (2005).
46. Selmecki, A. M. et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. *Nature* 519, 349–352 (2015).
47. Wertheimer, N. B., Stone, N. & Berman, J. Ploidy dynamics and evolvability in fungi. *Phil Trans R Soc B* 371, 20150461 (2016).
48. Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L. & Munhoz, C. de F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 39, 312–328 (2016).
49. Guichoux, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 591–611 (2011).
50. Prosperi, M. C. F. et al. A novel methodology for large-scale phylogeny partition. *Nat. Commun.* 2, 321 (2011).
51. Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11, 94 (2010).
52. Hellborg, L. & Piškur, J. Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryot. Cell* 8, 1739–1749 (2009).
53. Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M. & Karst, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–2102 (2007).
54. Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G. & Polsinelli, M. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543–1552 (1994).
55. Walt, J. P. V. der & Kerken, A. E. V. The wine yeasts of the Cape. *Antonie Van Leeuwenhoek* 26, 292–296 (1960).
56. Magwene, P. M. Revisiting Mortimer’s Genome Renewal Hypothesis: Heterozygosity, Homothallism, and the Potential for Adaptation in Yeast. in *Ecological Genomics* (eds. Landry, C. R. & Aubin-Horth, N.) 37–48 (Springer Netherlands, 2014).

57. Mulla, W., Zhu, J. & Li, R. Yeast: a simple model system to study complex phenomena of aneuploidy. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 201–212 (2014).
58. Zhu, Y. O., Sherlock, G. & Petrov, D. A. Whole Genome Analysis of 132 Clinical *Saccharomyces cerevisiae* Strains Reveals Extensive Ploidy Variation. *G3 Genes Genomes Genet.* 6, 2421–2434 (2016).
59. Selmecki, A., Forche, A. & Berman, J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313, 367–370 (2006).
60. Albertin, W. et al. Evidence for autotetraploidy associated with reproductive isolation in *Saccharomyces cerevisiae*: towards a new domesticated species. *J. Evol. Biol.* 22, 2157–2170 (2009).
61. Querol, A. & Bond, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 1–10 (2009).
62. Steensels, J. et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 947–995 (2014).
63. Libkind, D. et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 14539–14544 (2011).
64. Bing, J., Han, P.-J., Liu, W.-Q., Wang, Q.-M. & Bai, F.-Y. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr. Biol.* 24, R380–R381 (2014).
65. Gayevskiy, V. & Goddard, M. R. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environ. Microbiol.* 18, 1137–1147 (2016).
66. Le Jeune, C. et al. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.* 7, 540–549 (2007).
67. Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. & Dubourdieu, D. New Hybrids between *Saccharomyces* Sensu Stricto Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3887–3892 (1998).
68. Naumov, G. I. et al. Natural Polyploidization of Some Cultured Yeast *Saccharomyces* Sensu Stricto: Auto- and Allotetraploidy. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 442–449 (2000).
69. Sipiczki, M. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* 8, 996–1007 (2008).
70. Stebbins, G. Ledyard. The Significance of Polyploidy in Plant Evolution. *Am. Nat.* 74, 54–66 (1940).
71. Babcock, E. B. (Ernest B., 1877, B., Stebbins, G. L. (George L. & 1906-. American species of *Crepis*. (1938).
72. Sanna, V. & Pretti, L. Effect of wine barrel ageing or sapa addition on total polyphenol content and antioxidant activities of some Italian craft beers. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 700–707 (2015).
73. Mortimer, R. K. Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. *Genome Res.* 10, 403–409 (2000).
74. Fundyga, R. E., Lott, T. J. & Arnold, J. Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infect. Genet. Evol.* 2, 57–68 (2002).
75. Almeida, P. et al. A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication. *Mol. Ecol.* 24, 5412–5427 (2015).
76. Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Liti, G., Wang, S.-A. & Bai, F.-Y. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Mol. Ecol.* 21, 5404–5417 (2012).
77. Sniegowski, P. D., Dombrowski, P. G. & Fingerman, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display

- different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1, 299–306 (2002).
78. Sampaio, J. P. & Gonçalves, P. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2144–2152 (2008).
 79. Divol, B., Du, T. & Duckitt, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–613 (2012).
 80. Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdigones, F. & Jimenez, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003 (1996).
 81. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234 (2000).
 82. Kamvar, Z. N., Tabima, J. F. & Grünwald, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2, e281 (2014).
 83. Bruvo, R., Michiels, N. K., D'souza, T. G. & Schulenburg, H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13, 2101–2106 (2004).
 84. Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290 (2004).
 85. Jombart, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403–1405 (2008).
 86. Frichot, E. & François, O. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods Ecol. Evol.* 6, 925–929 (2015).
 87. Höhna, S., May, M. R. & Moore, B. R. TESS: an R package for efficiently simulating phylogenetic trees and performing Bayesian inference of lineage diversification rates. *Bioinformatics* 32, 789–791 (2016).

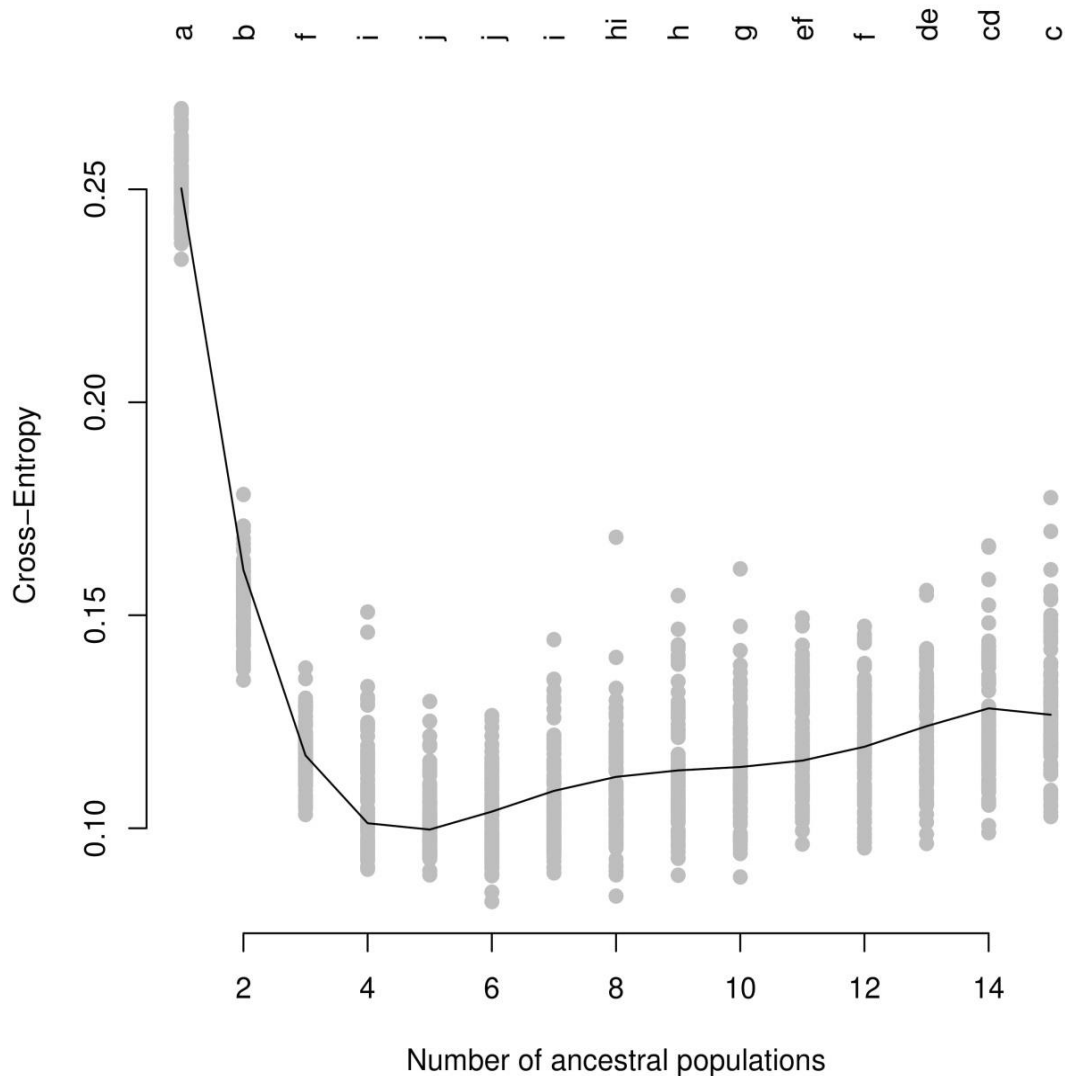
Acknowledgments

The authors would like to thank the CIVB (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux) and Région Aquitaine for the financial support. Also, the authors thank Lucile Pic (ICV, France), Virginie Serpaggi (Inter Rhône, France), Manuel Ferreira (Technical University of Lisbon, Portugal), Marcos Morais (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil), Morvan Koarer (IFV, France), Microflora (France), Marc-André Lachance (University of Western Ontario, Canada), Marina Bely (ISVV, France), Cécile Thibon (ISVV, France), Hervé Alexandre (Université de Bourgogne, France), Cédric Longin (Université de Bourgogne, France), Iavor Tchobanov (University of Food Technology, Plovdiv, Bulgaria), and all organisations, researchers and winemakers who provided isolates and contaminated wine samples for the purpose of this study.

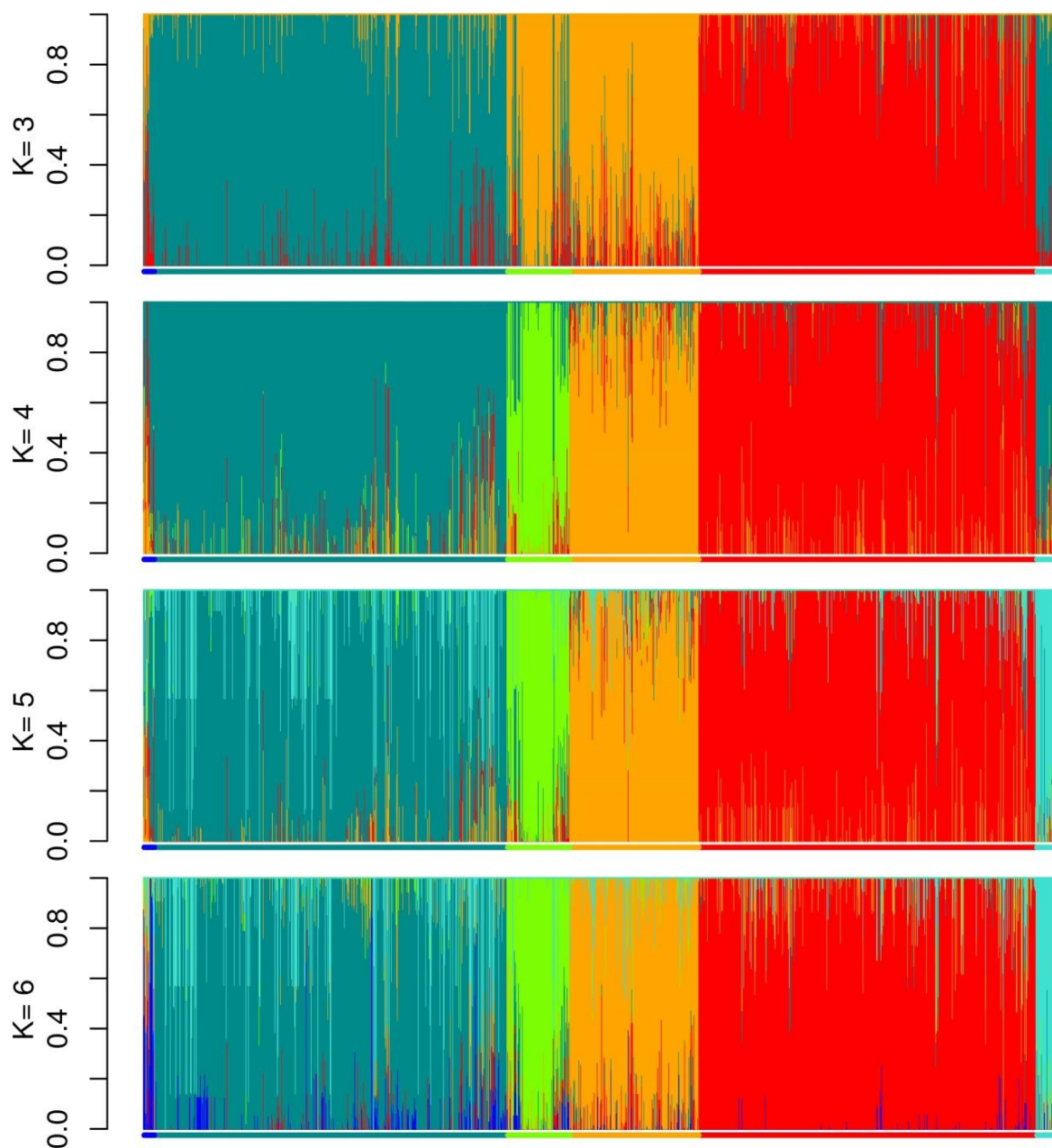
Annexes M. Avramova *et al.*, soumis : Supplementary Table S. 2.1 Microsatellite loci for *B. bruxellensis* genotyping.

Microsatellite name	Motif	Primers ^a	Fluorescent dies	Tm, °C	Contig# (position), AWRI1499	Scaffold#, strain CBS 2499	Allele size (number of repeats), AWRI1499 ^b	Coding sequence	Ho (observed heterozygosity)
B224	CTT/GCT	F: TGCAAGTTCTGCAGCGTT; R: ACCAACAACAGCAAAGACACG	FAM	53	#224 (397513)	6	103(1); 106(640); 109(1499); 112(27); 127(554)	NA	0,459
B174	GAT	F: TGGTGCTTAGAGCAGATGATG R: GCAACTGTTCCAATGAATTCC	FAM		#174 (2420882)	1	184(2); 187(8); 190(1); 193(91); 196(1497); 199(1); 202(2); 205(559); 214(1)	Riboflavin aldehyde-forming enzyme [EIF47072.1]	0,447
D9b	ATG	F: TAATGAGAGAAGATGGAAAG R: TTGCACAACCTGTTTTTCTA	FAM	53	#190 (32569)	9	308(768); 323(5); 329(1); 332(1); 335(3); 338(46); 341(627); 383(1160); 389(178); 440(7); 443(1)	NA	0,899
B101	GAA/GAT	F: CACGCAAAGAAAGATGAGGA R: TGCCATTCTTATCCAAGTTG	HEX	56	#101 (118087)	3	134(7); 137(20); 140(960); 143(1088); 146(727); 149(1); 152(1); 161(7)	NA	0,858
B135c	CAA/AAC	F: ACATGCAAGACGTGCTCAAAG R: TGATCTCTTCTGCAGCA	HEX	53	#135 (21220)	2	285(10); 288(2); 297(39); 312(8); 315(1); 318(1); 321(31); 324(3); 327(644); 333(26); 336(579); 339(24); 342(502); 345(2); 348(45); 354(4); 357(561); 363(201)	NA	0,865
B122c	ATC	F: GAAAACGAGTTCGGAAGACT R: AAAAATGAACGTGGTGATG	HEX		#122 (18840)	7	329(7); 335(4); 338(1243); 341(6); 344(1); 353(529); 356(1); 377(1); 413(2); 428(90); 443(41)	Putative histone acetyltransferase saga complex component [EIF47840.1]	0,453
D2	TGA/TGG	F: GCCATCATTGTGACTGTGCTT R: CATTTCGTTTCCAACCTCA	AT550	56	#104 (12956)	2	94(8); 103(5); 106(889); 109(758); 118(180)	NA	0,247
B301	TTG/CTG	F: GTATGCTTCCGGGACTTGATT R: GCGACTTCAACAGCAGCTTAA	AT550		#301 (326230)	7	139(5); 142(3); 145(1493); 148(133); 151(542); 154(565); 175(208); 178(1); 181(39)	NA	0,615
D10b	TGC/TGT	F: CTCTGCATTGCTTACTTAGAC R: TTCCATTATGATGGCAGGG	AT550	53	#96 (16790)	10	219(4); 234(1); 237(201); 246(5); 249(8); 252(1193); 255(602); 261(8); 264(13); 273(564); 276(7); 282(1)	NA	0,806
B273	TTA/ATT	F: CTGCAAGAAGATGAATTGGAA R: ACCTTTGGATTGCCCTTT	AT565	53	#273 (521465)	6	153(1452); 156(794); 159(13)	NA	0,544
B22	ATG	F: TTAGGTGGTTATCCGGAGGAG R: TATCCTCGTCAGCTTCTGCTT	AT565	56	#22 (241906)	8	189(41); 195(1); 201(216); 204(8); 207(786); 210(1); 213(18); 216(802); 219(1); 222(4); 225(776); 228(1); 231(22); 243(1); 252(1); 261(7); 264(7); 273(524)	NA	0,625
D1	ACA	F: AGGAGGCTCCCGAAATGT R: GTGCAAATGGGGTGGAGA	AT565		#258 (60314)	1	285(10); 288(2); 297(39); 312(8); 315(1); 318(1); 321(31); 324(3); 327(644); 333(26); 336(579); 339(24); 342(502); 345(2); 348(45); 354(4); 357(561); 363(201)	NA	0,792

^a Forward primers were tailed on 5'-end with M13 sequence (CACGACGTTGAAAACGAC)^b Allele size in bp

Annexes Avramova *et al.*, soumis : Supplementary Figure S-2.1.

Supplementary Figure S-2.1. Entropy analysis for estimating the number of ancestral populations that explains the genotypic data in the best way. Different letters correspond to the significance groups according to Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$).

Annexes Avramova *et al.*, soumis Supplementary Figure S-2.2

Supplementary Figure S-2.2. STRUCTURE plots for K= 3, 4, 5, and 6. Each bar represents a strain and the colour of the bar represents the estimated ancestry proportion of each of the K clusters. The same colour code is kept as in previous figures. K=5 is the number of ancestral population with lowest entropy.

ANNEXE 4 : Validation de la méthode de quantification des sucres résiduels dans les vins rouges par GC-FID modifiée à partir de la méthode développée par Rosella Triquet-Pissard (1979) et décrite dans la publication de Chatonnet et coll. (1995).

Sucre	Equation	R ²	Gamme de concentrations	Répétabilité (n=10) CV(%)	Limite de détection (mg/L)	Limite de quantification (mg/L)
D-glucose+D-fructose	$y = 0,0022x - 0,0576$	0,992	0 - 4g/l	7,8	0,15	0,52
D-galactose	$y = 0,0047x + 0,0065$	0,982	0 - 1g/l	10,5	0,35	1,17
D-mannose	$y = 0,0014x + 0,0621$	0,980	0 - 400mg/l	10,6	1,35	4,49
D-ribose	$y = 0,0013x + 0,0033$	0,999	0 - 1g/l	5,4	0,24	0,85
L-arabinose	$y = 0,0011x + 0,0244$	0,994	0 - 1g/l	7,9	0,13	0,44
D-xylose	$y = 0,001x + 0,0142$	0,985	0 - 1g/l	8,8	0,52	1,73
L-rhamnose	$y = 0,0005x - 0,0066$	0,996	0 - 1g/l	8,6	0,31	1,31
Lactose	$y = 0,0007x - 0,009$	0,967	0 - 400mg/l	7,7	1,16	3,87
Maltose	$y = 0,0026x + 0,044$	0,997	0 - 400mg/l	6,9	0,27	0,88
Tréhalose	$y = 0,0021x - 0,0056$	0,999	0 - 1g/l	2,8	0,99	3,3
Cellobiose	$y = 0,0015x - 0,0165$	0,995	0 - 1g/l	9,1	0,44	1,74
Mélibiose	$y = 0,0013x - 0,0189$	0,992	0 - 1g/l	11,1	0,15	0,49
Raffinose	$y = 0,0001x - 0,0007$	0,923	0 - 400mg/l	17,5	1,13	3,75
Mannitol	$y = 0,0032x - 0,0079$	0,999	0 - 1g/l	2,5	0,63	2,11
Sorbitol	$y = 0,0033x - 0,0302$	0,999	0 - 1g/l	2,1	0,61	2,02

n : nombre de répétitions.

ANNEXE 5 : Origine (millésime, pays, région de France) des isolats du groupe génétique AWRI1499-like triploïde en fonction de leur groupe de clone (i.e. génotypes rassemblant au minimum 2 individus).

Nombre d'isolats	Numéro du génotype	Millésime	Pays	Région (France)
2	1	2010	France	Bordeaux
2	6	2013	France	Bordeaux
2	18	2013	France	Bordeaux
2	27	2013	France	Bordeaux
2	38	2013	France	Bordeaux
2	85	2013	France	Bordeaux
2	88	2013	France	Bordeaux
2	90	2013	France	Bordeaux
2	93	2013	France	Bordeaux
2	218	2014	France	Languedoc
2	237	2003, 2014	France	Cote du Rhone, Bordeaux
2	279	2002, 2013	Italie, Argentine	
2	515	2009	France	Bourgogne
3	15	2012, 2014	France	Bordeaux
3	104	2014	France	Bordeaux
3	180	2002, 2009, 2014	Australie	
3	182	2001, 2003, 2013	France, Portugal, Australie	Côte du Rhône
3	213	2014	France	Languedoc
3	378	2001, 2003	Afrique du Sud, Chili	
4	13	2012, 2013	France	Bordeaux
4	70	2012, 2013, 2014	France	Bordeaux
4	242	2003, 2012, 2013	France, Italie, Afrique du Sud	Bordeaux
5	474	2009	France	Bourgogne
10	7	1990, 2012, 2013	France	Bordeaux
10	21	2012, 2013	France	Bordeaux
10	24	2013, 2014	France	Bordeaux
11	50	1990, 2012, 2013, 2014	Italie, France	Languedoc, Bordeaux
15	5	2010, 2012, 2013	France	Bordeaux
15	16	2012, 2013	France	Bordeaux

ANNEXE 5 : suite.

Nombre d'isolats	Numéro du génotype	Millésime	Pays	Région (France)
18	216	2003, 2013, 2014	France, Italie	Languedoc, Côte du Rhône
29	178	2002, 2007, 2009, 2013, 2014	Australie, Italie, Mexique, Etats-Unis, France	Bourgogne
33	8	2012, 2013	Italie, France	Bordeaux
171	2	1990, 2003, 2010, 2012, 2013, 2014	France, Afrique du Sud	Bordeaux

* le numéro de génotype a été attribué aléatoirement.

ANNEXE 6 : Origine (millésime, pays, région de France) des isolats du groupe génétique CBS2499-like diploïde en fonction de leur groupe de clone (i.e. génotypes rassemblant au minimum 2 individus).

Nombre d'isolats	Numéro du génotype	Millésime	Pays	Région (France)
2	25	2013	France	Bordeaux
2	66	1985, 2013	France	Bordeaux
2	67	2013	France	Bordeaux
2	83	2013	France	Bordeaux
2	95	2013	France	Bordeaux
2	97	2013	France	Bordeaux
2	112	1912	France	Bordeaux
2	126	1948, 1967	France	Bordeaux
2	141	1982	France	Bordeaux
2	142	1982, 2009	France	Bordeaux, Bourgogne
2	190	2014	France	Languedoc
2	192	2014	France	Languedoc
2	194	2014	France	Languedoc
2	234	2003, 2012	France	Côte du Rhône
2	406	2001, NA	France, Nouvelle- Zélande	Languedoc
2	416	2003	Etats-Unis	
2	439	1990, 2013	France, Italie	Bordeaux
2	579	2013	Italie	
3	10	2012, 2013	France	Bordeaux
3	37	2013	France	Bordeaux
3	76	2002, 2013, 2014	France, Portugal	Bordeaux
3	82	2013, 2014	France	Bordeaux
3	101	1990, 2012, 2014	France	Bordeaux
3	102	1961, 1982, 2014	France	Bordeaux
3	117	1934	France	Bordeaux
3	133	1961, 1996	France	Bordeaux
3	206	2014	France	Languedoc
3	361	2005, 2009	France, Afrique du Sud	Bourgogne
4	109	1911, 1939	France	Bordeaux

ANNEXE 6 : suite.

Nombre d'isolats	Numéro du génotype	Millésime	Pays	Région (France)
4	127	1959	France	Bordeaux
4	203	2014	France	Languedoc
4	247	2012	Danemark	
5	71	2013	France	Bordeaux
5	185	1995, 2003, 2013, 2014	Australie, Portugal, Italie, Afrique du Sud	
7	100	1961, 1968, 2000, 2014	France	Bordeaux
7	114	1926, 1948, 1967, 1970	France	Bordeaux
8	11	1961, 2012, 2013, 2014	France	Bordeaux
9	12	2003, 2012, 2013	France	Languedoc, Bourgogne, Bordeaux
9	115	1909, 1926, 1948, 1970, 2001, 2012	France	Bordeaux
10	110	1911, 1939, 1961	France	Bordeaux
12	29	1972, 2003, 2013, 2014	Etats-Unis, France	
18	47	1985, 1996, 2013	France	Bordeaux
18	196	2014	France	Languedoc
45	30	1959, 1961, 1968, 1996, 2003, 2013, 2014	France	Bordeaux
51	52	1949, 1999, 2004, 2012, 2013, 2014	Australie, Italie, Allemagne, Brésil, Afrique du Sud, France	Côte du Rhône, Languedoc, Bordeaux
95	19	1985, 1990, 1993, 1994, 1995, 1996, 1999, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2009, 2012, 2013, 2014	Danemark, Portugal, Etats-Unis, France	Bourgogne, Bordeaux

Génotypes en gras : spécifiquement associés à des individus isolés de millésimes antérieurs à 1990.

ANNEXE 7 : Origine (millésime, pays, région de France) des isolats du groupe génétique AWRI1608-like triploïde en fonction de leur groupe de clone (i.e. génotypes rassemblant au minimum 2 individus).

Nombre d'isolats	Génotype	Millésime	Pays	Région (France)
2	161	2014	France	Côte du Rhône
2	166	2014, NA	France, Liban	Côte du Rhône
2	253	2012	Danemark	
2	267	2012	Danemark	
2	429	2009, NA	France	Bourgogne, Languedoc
2	431	2014	France	Bordeaux
2	475	2009	France	Bourgogne
2	482	2009	France	Bourgogne
2	484	2007, 2009	France	Bourgogne
2	488	2009	France	Bourgogne
2	494	2009	France	Bourgogne
2	501	2009	France	Bourgogne
3	262	2012	Danemark	
3	384	2003, 2009	France	Bordeaux, Bourgogne
3	472	2009	France	Bourgogne
4	235	2012	France, Portugal	Côte du Rhône
6	170	2001, 2002, 2012	Australie, France, Italie	Côte du Rhône
6	477	2009	France	Bourgogne
6	492	2009	France	Bourgogne
36	156	2009, 2013, 2014	France	Bourgogne, Côte du Rhône

ANNEXE 8: Origine (millésime, pays, région de France) des isolats du groupe génétique L14165-like diploïde en fonction de leur groupe de clone (i.e. génotypes rassemblant au minimum 2 individus).

Nombre d'isolats	Génotype	Millésime	Pays	Région (France)
2	304	2014	Italie	
2	463	NA	Brésil	
2	605	NA	Italie	
2	612	NA	Italie	
2	614	NA	Italie	
4	208	2014	France	Languedoc

ANNEXE 9: Origine (millésime, pays, région de France) des isolats du groupe génétique L0308-like triploïde en fonction de leur groupe de clone (i.e. génotypes rassemblant au minimum 2 individus).

Nombre d'isolats	Génotype	Millésime	Pays	Région (France)
2	427	2009, NA	France	Bourgogne, Languedoc
3	191	2002, 2014	France, Italie, Portugal	Languedoc
9	198	2014	France, Italie, Portugal	Languedoc

ANNEXE 10 : Profil de consommation en sucres des 46 de *B. bruxellensis*.

Souche	Substrat	Groupe génétique	Nombre d'essais	C6				C5				Disaccharides				Polyalcools		Total des sucres consommés				
				Glucose	Fructose	Mannose	Galactose	Ribose	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Cellobiose	Maltose	Saccharose	Tréhalose	Lactose	Mélibiose		Sorbitol	Mannitol		
L14195	Biere	CBS2499-like (2n)	1	1	1	1	1	1	1	-	-	(1)	1	1	1	1	(1)	-	(1)	1	11	
L14186	Cidre		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	(1)	-	-	-	8
KOM1460	Kombucha		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L14160	Kombucha		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
11AVB4	Vin		1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	4
13EN11C5	Vin		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
CBS2499	Vin		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
L02/E2 AZ	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	-	10
L14163	Vin		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
L0469 (GC 19)	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L0611	Vin		2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L14168	Vin		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	6
DEN6_12_9	Vin		1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	5
CBS 3025	Bière		L14165-like (2n)	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
KOM1449	Kombucha	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8	
KOM1455	Kombucha	AWRI1499-like (3n)	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8	
KOM14120	Kombucha		1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	7
13EN11C11 (GC 2)	Vin		2	1	1	1*	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L0424 (GC 2)	Vin		3	1	1*	1*	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
AWRI 1499	Vin		3	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L0516	Vin		1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
L06/034 AZ	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L14156	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L14190	Vin		2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
LB15109p	Vin		1	1	-	-	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	7
VP1545	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
GSP1504	Bière	AWRI1608-like (3n)	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	(1)	1	1	1	-	-	-	-	8	
GSP1516	Bière		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	(1)	9
GSP1518	Bière		1	1	nd	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
KOM 14106	Kombucha		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8
UWOPS 92- 239.3	Tequila		1	1	1	1	1	1	(1)	-	-	-	-	nd	nd	1	1	1	(1)	-	-	7
AWRI 1608	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	(1)	-	9
CDR 222	Vin		2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	-	10
ISA1700	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L0422	Vin		2	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	(1)	-	9
L14173	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9
L14183	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	10
YJS5400	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	(1)	10
AWRI 1677	Vin		1	1	1	1	1	1	1	-	(1)	-	-	1	1	1	1	-	-	1	(1)	10
JP258V2013-C7	Bioéthanol		CBS5512-like (3n)	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	(1)	-	9
JP354V2014-C8	Bioéthanol	1		1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	7
UWOPS 92- 244.4	Tequila	1		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	1	1	11
UWOPS 92- 255.4	Tequila	3		1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	8
UWOPS 92- 262.3	Tequila	1		1	1	1	-	1	-	(1)	(1)	-	-	1	1	1	(1)	(1)	(1)	-	-	7
B001-14 T28 1	Vin	L0308-like (3n)	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	9	
B001S-14 T49 3	Vin	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	8	
Total d'isolats ayant consommés le sucre				46	42	44	41	35	1	1	0	40	43	45	42	1	0	5	2			
% isolats ayant consommés le sucre				100%	91%	96%	89%	76%	2%	2%	0%	87%	93%	98%	91%	2%	0%	11%	4%			

* Résultats différents entre les réplicats. La consommation du substrat, lorsqu'elle a eu lieu, a été vérifiée par HPLC-RI.

GC : groupe de clones ; 1 : croissance/ (1) : croissance jusqu'à DO : 0,5, absence de production d'éthanol et d'acide acétique/ - : absence de croissance/ nd : absence de donnée.

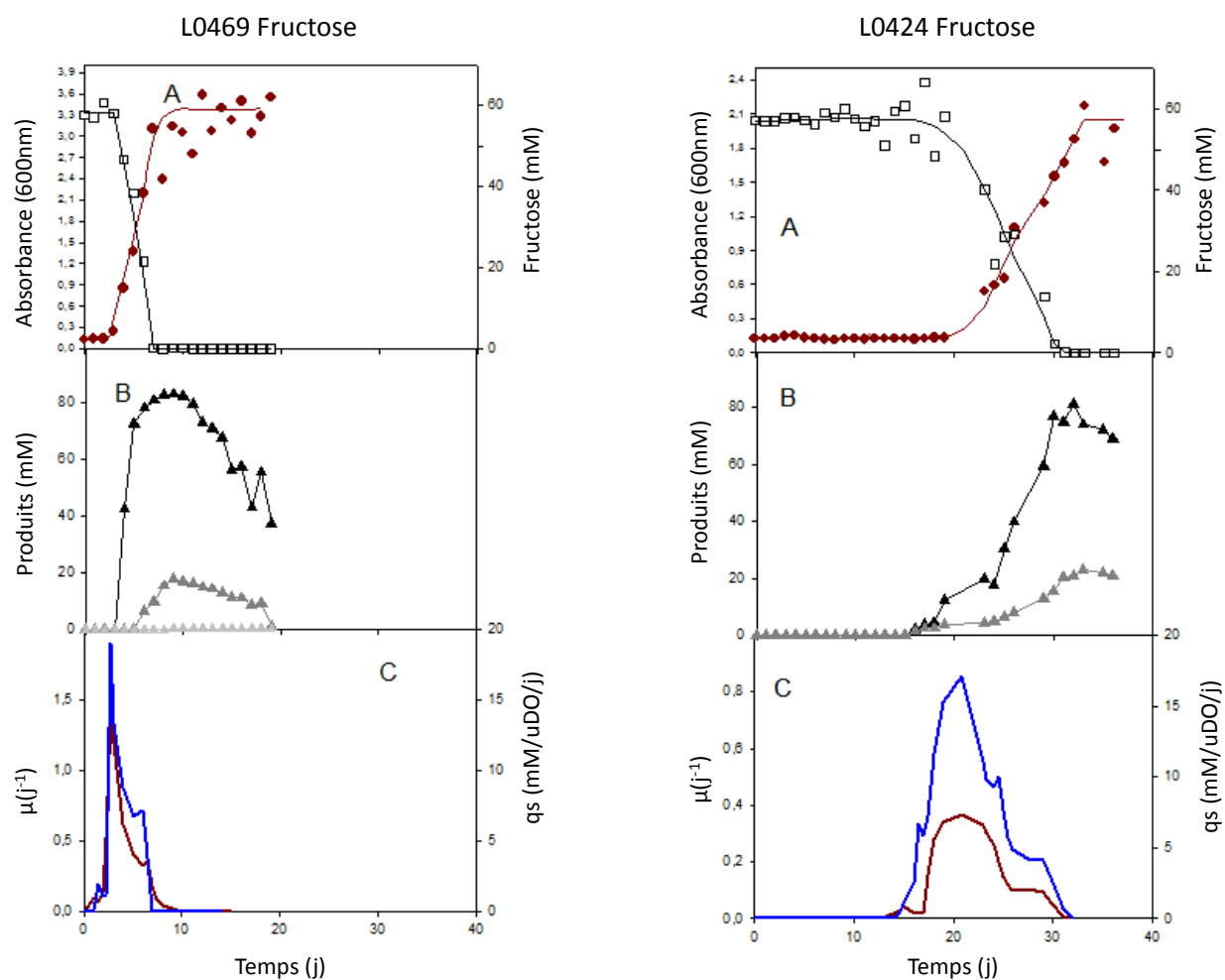
ANNEXE 11 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-fructose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Fructose (\square) et absorbance (\bullet); les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C. Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de fructose, q_s (tracé bleu).



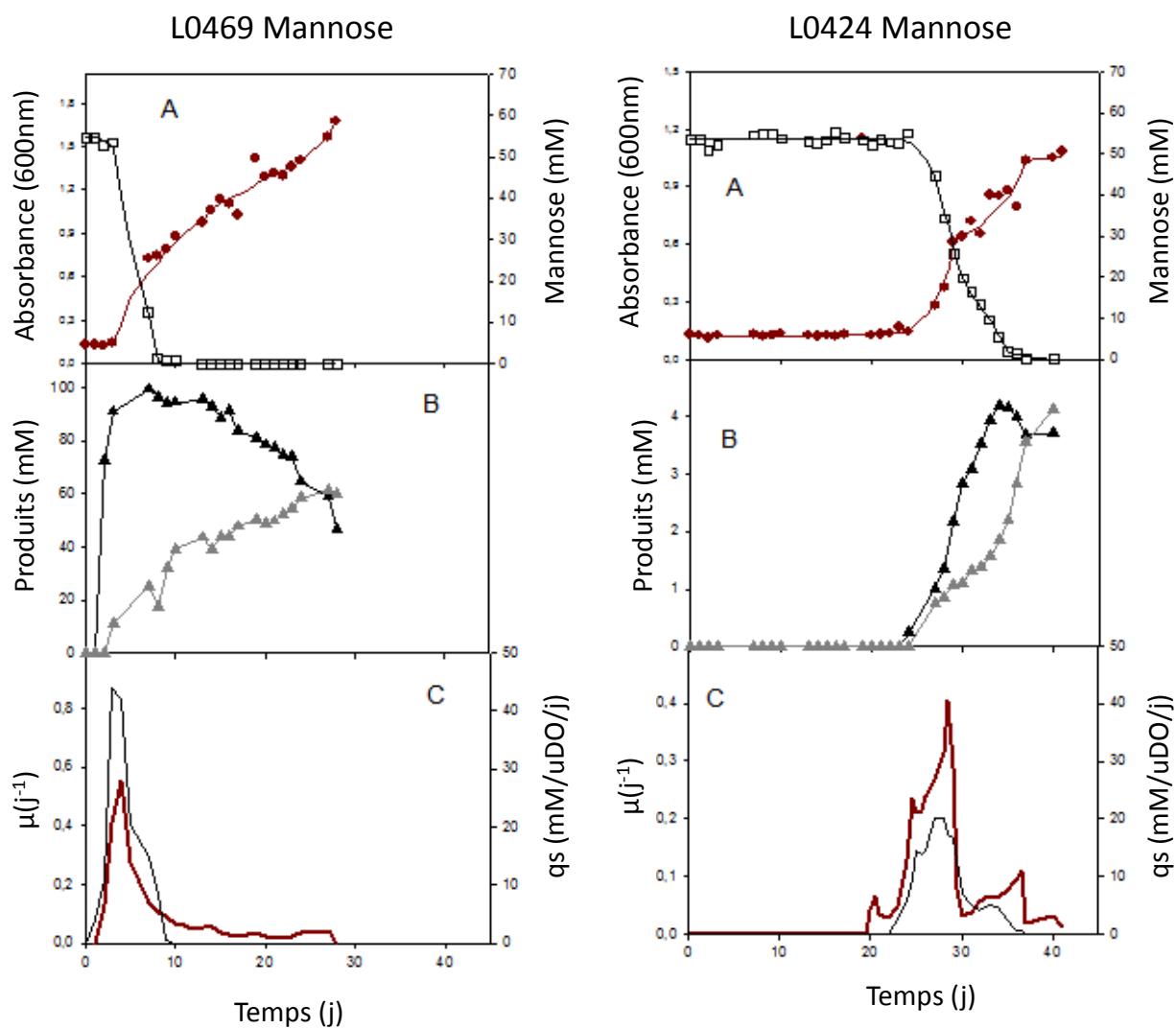
ANNEXE 12 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-mannose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Mannose (\square) et absorbance (\bullet); les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de mannose, q_s (tracé noir).



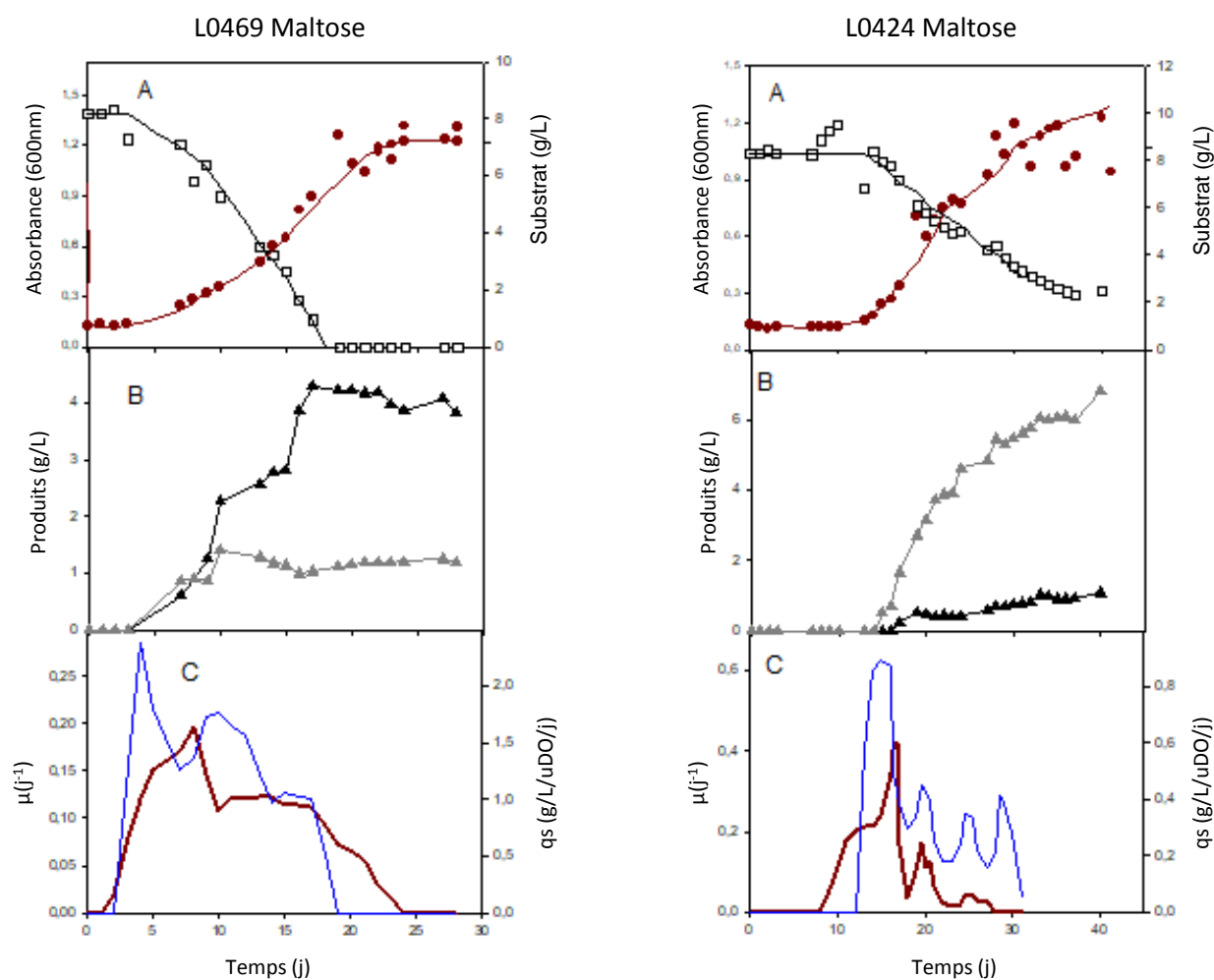
ANNEXE 13 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-maltose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Maltose (\square) et absorbance (\bullet); les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de maltose, q_s (tracé bleu).



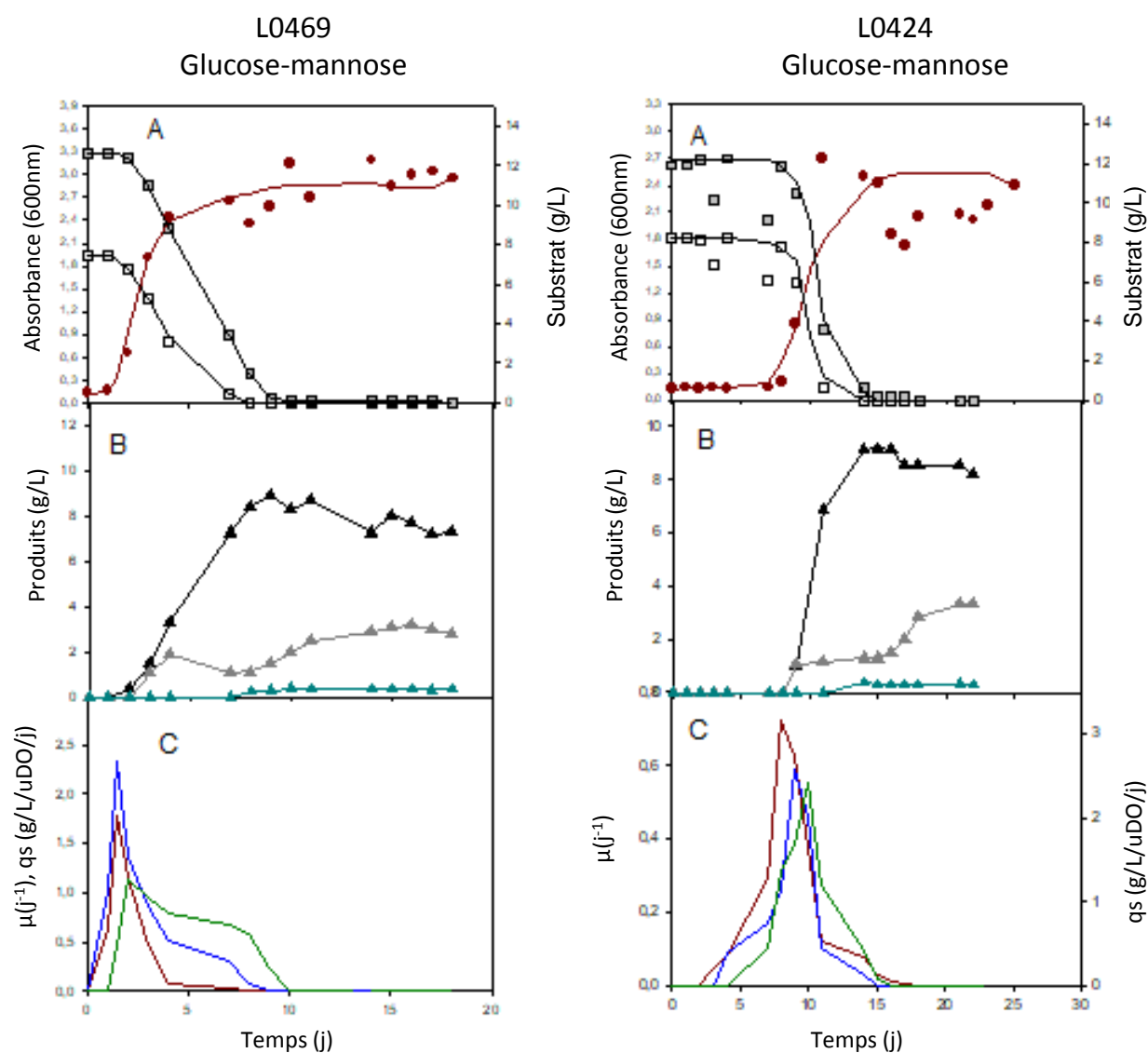
ANNEXE 14 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose et de D-mannose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), mannose (\blacksquare) et absorbance (\bullet); les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé bleu), et du mannose (tracé vert).



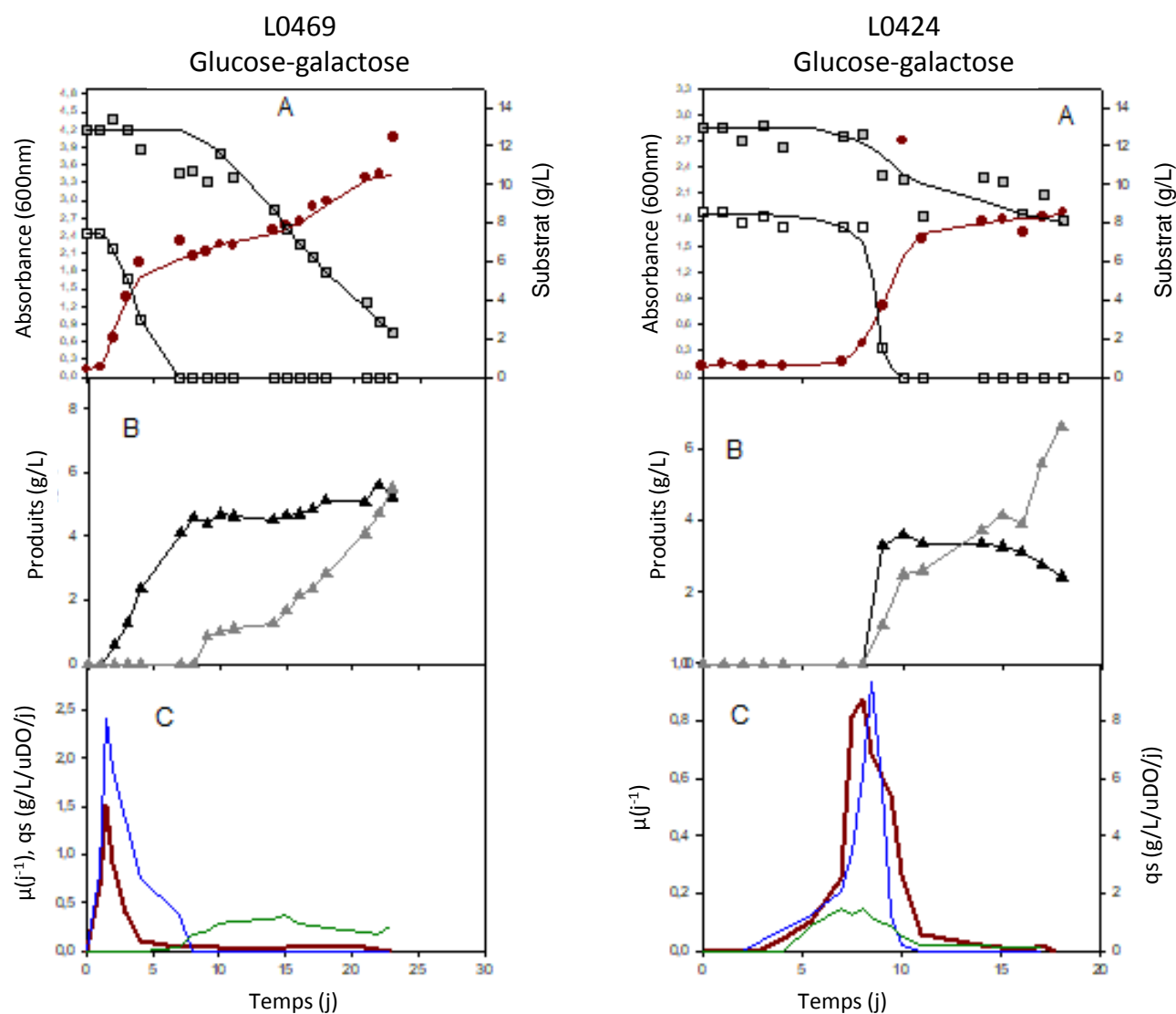
ANNEXE 15 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose et de D-galactose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), galactose (\blacksquare) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé bleu), et du galactose (tracé vert).



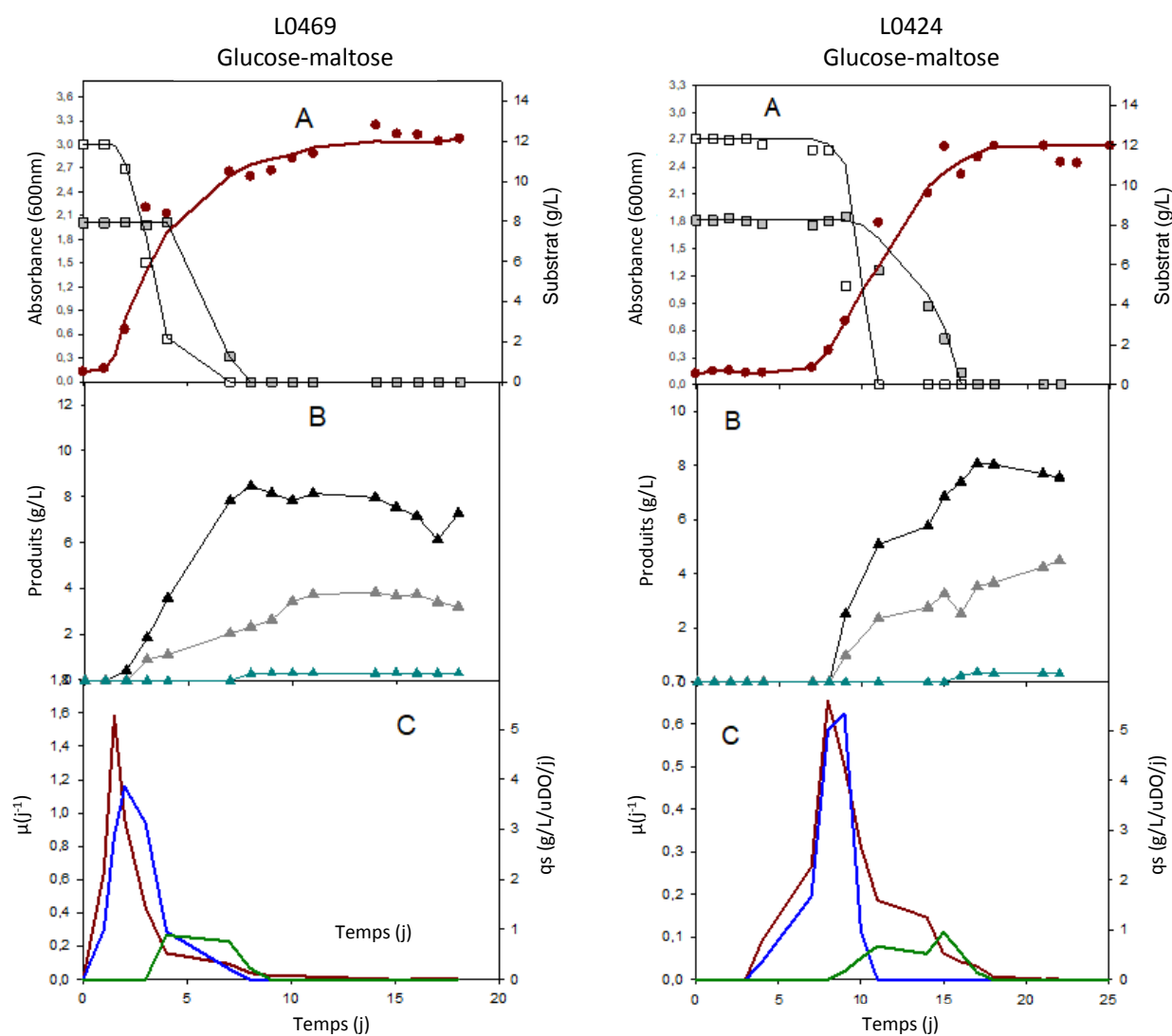
ANNEXE 16 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose et de D-maltose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), maltose (\blacksquare) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé bleu), et du maltose (tracé vert).



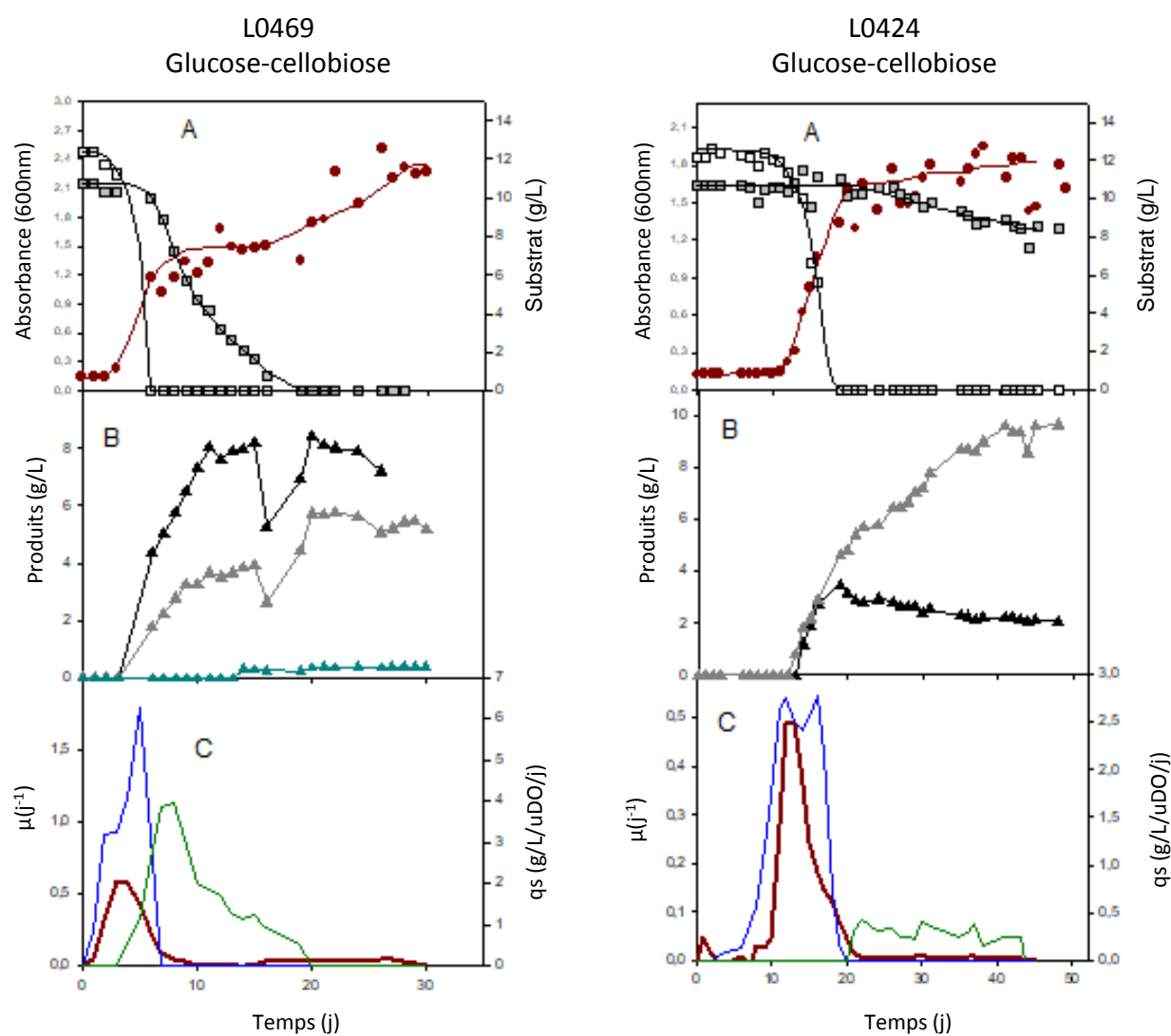
ANNEXE 17 : Croissance, consommation et production de métabolites secondaires des souches L0424 et L0469 en présence de D-glucose et de D-cellobiose.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions aérobies, sous agitation constante.

A. Glucose (\square), cellobiose (\blacksquare) et absorbance (\bullet) ; les absorbances ont été lissées (tracé présenté) pour faciliter le calcul des taux de croissance et des vitesses de consommation q_s .

B. Ethanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), acétaldéhyde (\blacktriangle).

C Vitesse spécifique de croissance, μ , (tracé rouge) et vitesse spécifique de consommation de glucose, q_s (tracé bleu), et du cellobiose (tracé vert).



ANNEXE 18 : Profils de production de phénols volatils de 33 souches cultivées en milieu défini.

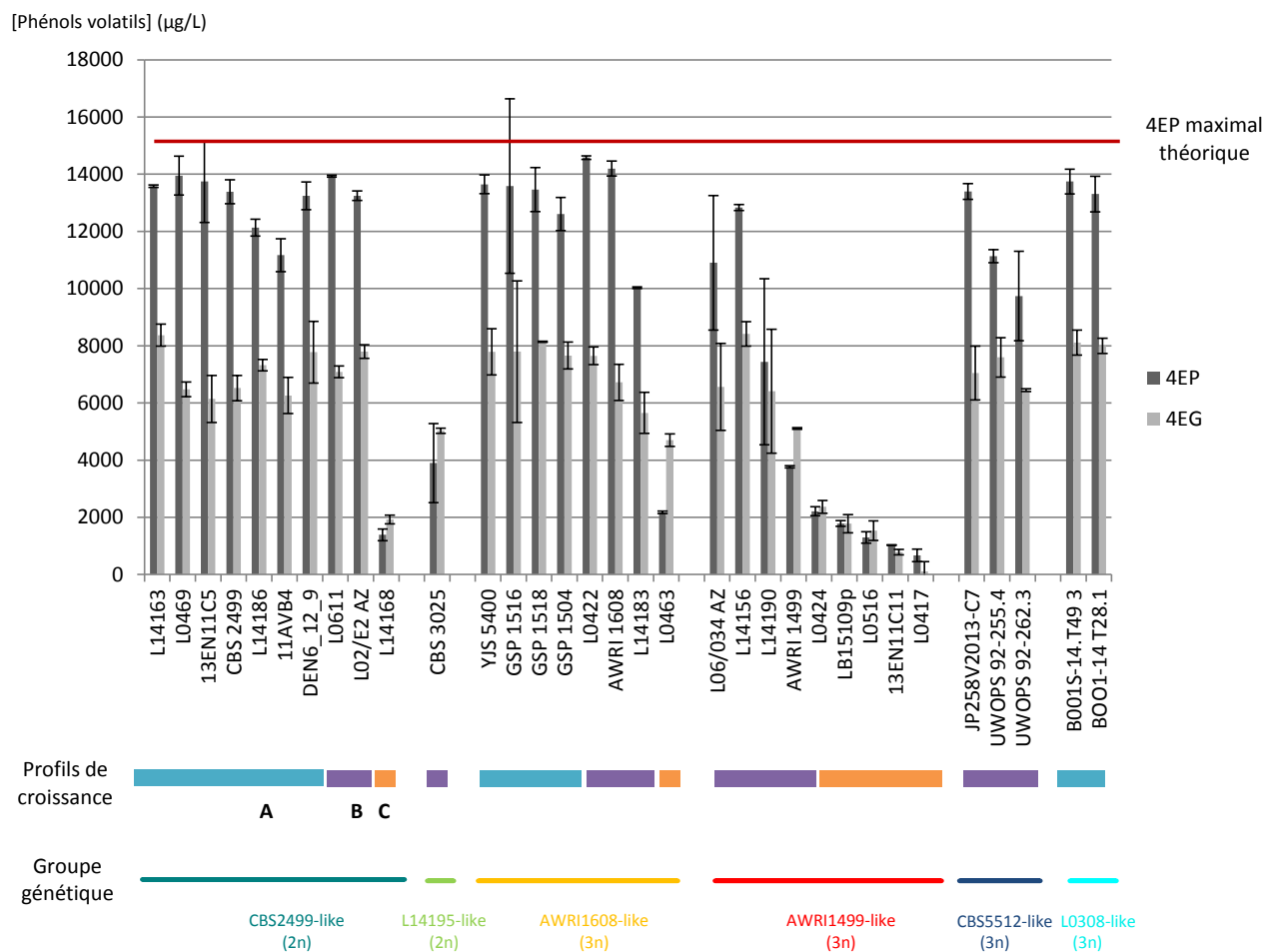
Quantités présentes à 60 jours de cultures réalisées en milieu défini, sans apport d'oxygène, à 25°C.

Pour chaque souche, les valeurs obtenues pour chaque réplicat sont indiquées.

Substrat	Groupe génétique	Souche	4EP	4VP	4EG	4VG	4EP/4EG
Vin	CBS2499-like (2n)	L14163	13 533 - 13 621	860 - 887	7 986 - 8 755	4 343 - 4 514	1,54 - 1,71
Vin		L0469	12 519 - 15 382	889 - 963	5 659 - 7 294	4 178 - 4 626	2,11 - 2,31
Vin		13EN11C5	13 582 - 13 905	920 - 921	5 902 - 6 376	4 410 - 4 612	2,18 - 2,30
Vin		CBS 2499	12 815 - 13 959	922 - 963	5 889 - 7156	4 849 - 5 044	1,95 - 2,18
Cidre		L14186	11457 - 12 809	904 - 907	7 061 - 7 580	4 622 - 4 845	1,51 - 1,81
Vin		11AVB4	10 872 - 11 464	1649 - 1 679	6 064 - 6 459	3 991 - 5 503	1,68 - 1,89
Vin		DEN6_12_9	12 759 - 13 729	857 - 875	6 699 - 8 855	4 379 - 5 079	1,55 - 1,90
Vin		L0611	13 520 - 14 351	957 - 1 071	6 645 - 7 528	5 019 - 6 107	1,91 - 2,03
Vin		L02/E2 AZ	13 215 - 13 281	868 - 899	7 598 - 8 005	4 419 - 4 832	1,65 - 1,75
Vin		L14168	1 183 - 1 594	7 428 - 8 496	1 768 - 2 078	14 271 - 14 845	0,67 - 0,77
Bière	L14165-like (2n)	CBS 3025	2 516 - 5 278	3 120 - 7 574	4 937 - 5 120	5 370 - 11 379	0,51 - 1,03
Vin	AWRI1608-like (3n)	YJS 5400	12874 - 14 415	895 - 1 037	7 771 - 7 806	4 481 - 4 858	1,65 - 1,85
Bière		GSP 1516	13 199 - 13722	921 - 980	7 514 - 8 768	4 915 - 6 119	1,56 - 1,76
Bière		GSP 1518	13 256 - 13 916	883 - 909	6 989 - 8 604	4 568 - 4 713	1,54 - 1,99
Bière		GSP 1504	12 541 - 12 671	927 - 962	7 350 - 7 968	3 729 - 4 735	1,57 - 1,72
Vin		L0422	14 002 - 15156	897 - 1 974	7 180 - 8 116	4 355 - 7 543	1,73 - 2,11
Vin		AWRI 1608	14 151 - 14 239	919 - 953	6 499 - 6 938	5 141 - 5 594	2,04 - 2,19
Vin		L14183	6 980 - 13 087	977 - 891	3 178 - 8 128	2 957 - 5 231	1,61 - 2,20
Vin		L0463	2 148 - 2 202	8 642 - 9 386	3 981 - 5 422	6 474 - 11 486	0,41 - 0,54
Vin	AWRI1499-like (3n)	L06/034 AZ	8 546 - 13 256	743 - 875	5 039 - 8 084	2 776 - 5 143	1,64 - 1,70
Vin		L14156	12 732 - 12 934	826 - 845	7 984 - 8 841	4 771 - 4 843	1,46 - 1,59
Vin		L14190	4 534 - 10 345	1 009 - 2 285	4 245 - 8 577	4 329 - 5 508	1,07 - 1,21
Vin		AWRI 1499	3 548 - 3 986	8 566 - 9 854	4 762 - 5 449	11 052 - 11 556	0,65 - 0,84
Vin		L0424	2055 - 2 367	3157 - 4 074	2 141 - 2 592	3 438 - 6 032	0,91 - 0,96
Vin		LB15109p	1 684 - 1 887	1 429 - 1 502	1 462 - 2 092	2 003 - 2 696	0,90 - 1,15
Vin		L0516	1 096 - 1 498	4 527 - 5 050	1 193 - 1 880	9 792 - 12 051	0,80 - 0,92
Vin		13EN11C11	1 018 - 1 036	3 271 - 3 418	692 - 876	6 807 - 8 532	1,16 - 1,50
Vin		L0417	637 - 707	598 - 645	83 - 141	231 - 742	5,03 - 7,60
Bioéthanol	CBS5512-like (3n)	JP258V2013-C7	13 119 - 13 675	861 - 878	6 110 - 7 990	4 642 - 4 718	1,64 - 2,24
Tequila		UWOPS 92-255.4	10 901 - 11 362	850 - 928	6 907 - 8 285	4 159 - 4 628	1,37 - 1,54
Tequila		UWOPS 92-262.3	8 173 - 11 303	778 - 826	6 404 - 6 498	3 563 - 4 001	1,28 - 1,74
Vin	L0308-like (3n)	B001S-14.T49 3	13 309 - 14 179	857 - 881	7 672 - 8 545	4 713 - 4 809	1,56 - 1,85
Vin		BOO1-14 T28.1	12 681 - 13 932	856 - 867	7 730 - 8 264	4 339 - 4 815	1,53 - 1,80

ANNEXE 19 : Concentrations de 4-éthylphénol et de 4-éthylguaïacol produites par 33 souches de *Brettanomyces bruxellensis* après 60 jours de culture.

Les cultures ont été réalisées en milieu défini supplémenté en acide *p*-coumarique (20 mg/L) et en acide férulique (20 mg/L), précurseurs des phénols volatils (25°C, sans apport d'oxygène). Profils de production de phénols volatils de 33 souches cultivées en milieu défini.



ANNEXE 20 : Profils de croissance, de consommation et de production de phénols volatils et de métabolites secondaires de la souche CBS2499 en fonction du substrat carboné.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions micro-aérobies, (agitation au moment des prélèvements)

Cultures simples :

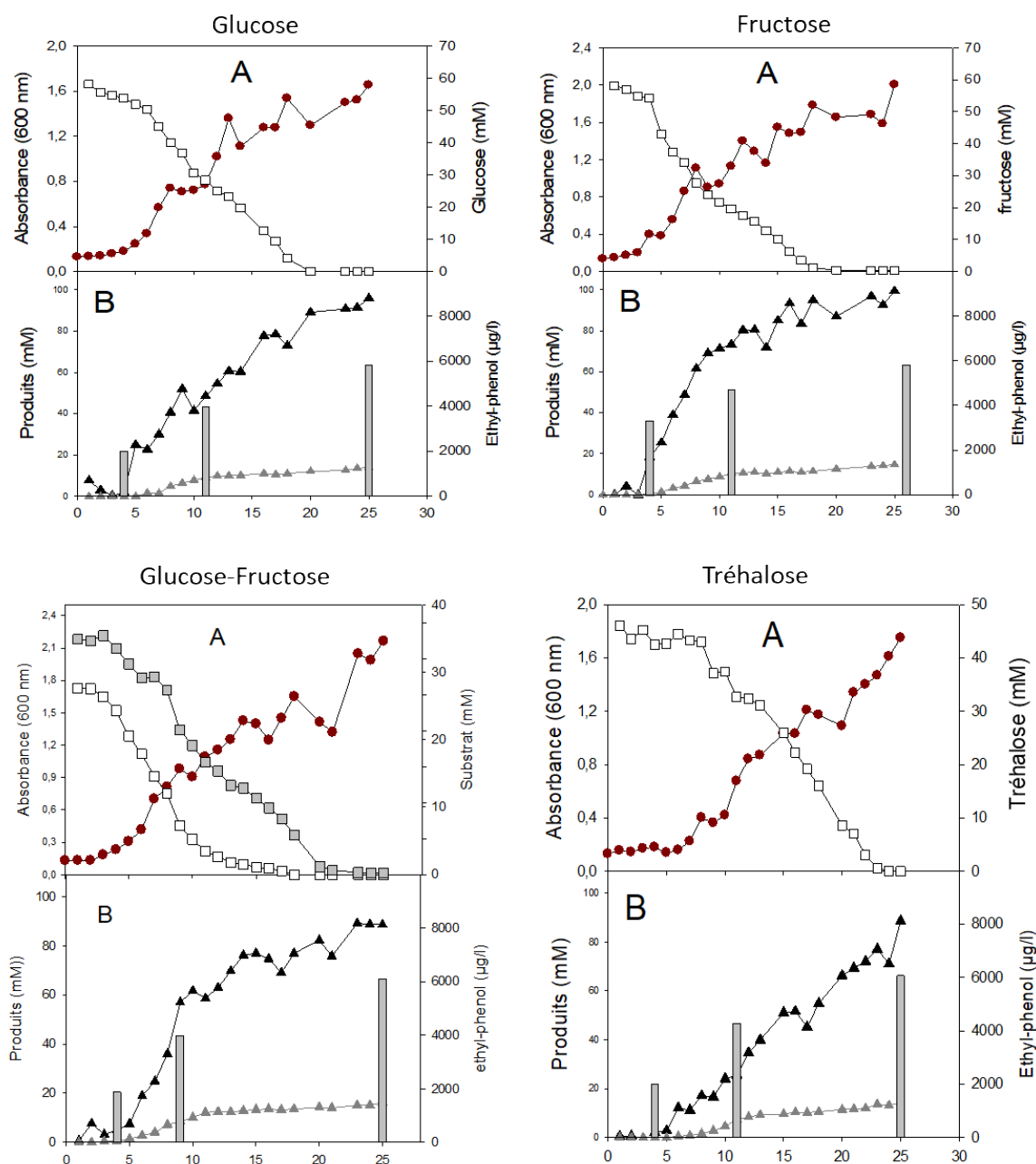
A : substrat (□), absorbance (●)

B : éthanol (▲), acide acétique (▲), 4-éthylphénol (■)

Culture en mélange :

A : substrat 1 (□) substrat 2 (■),

B : éthanol (▲), acide acétique (▲), 4-éthylphénol (■)



ANNEXE 21 : Profils de croissance, de consommation et de production de phénols volatils et de métabolites secondaires de la souche L0424 en fonction du substrat carboné.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions micro-aérobies, (agitation au moment des prélèvements)

Cultures simples :

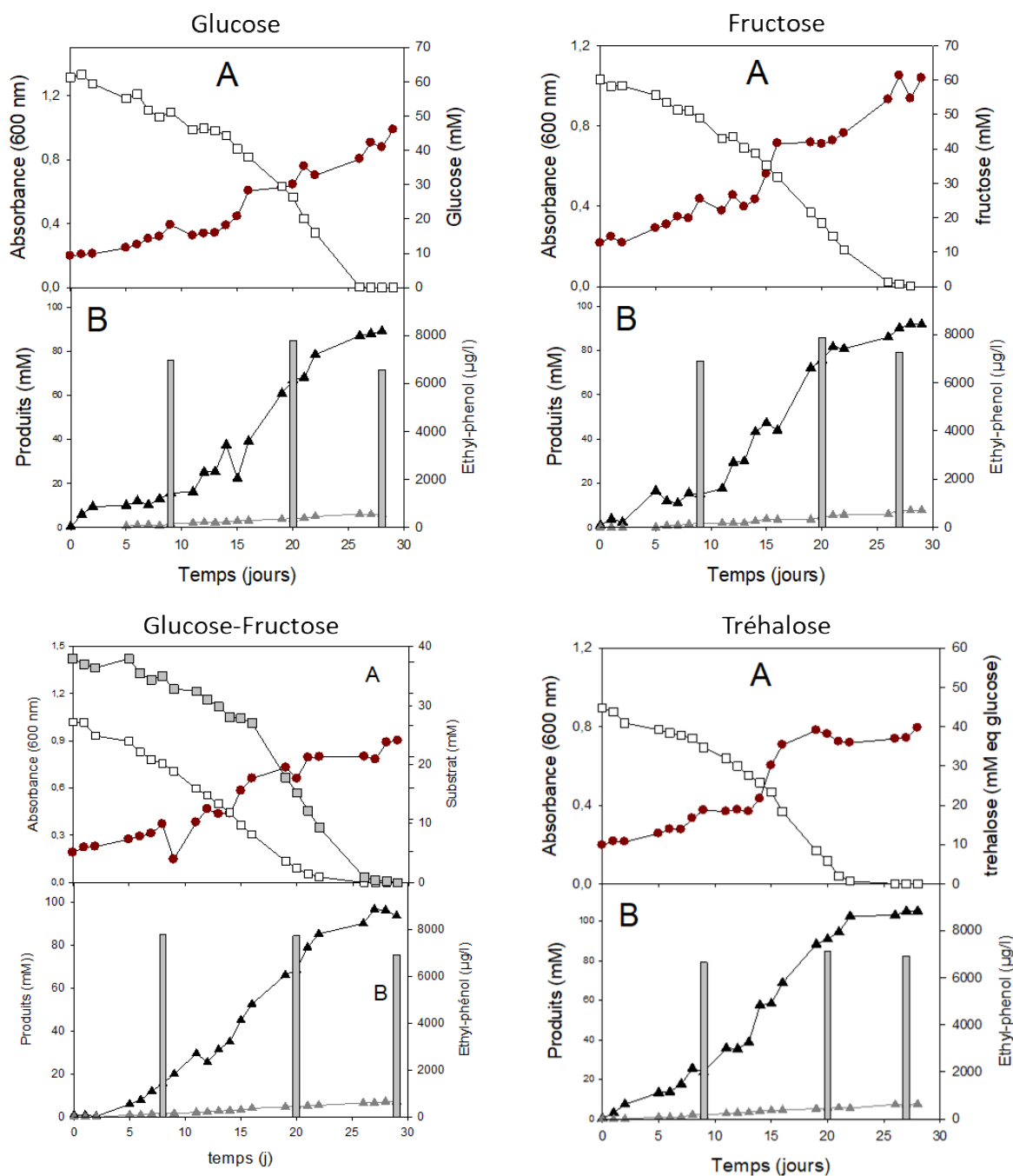
A : substrat (\square), absorbance (\bullet)

B : éthanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), 4-éthylphénol (\square)

Culture en mélange :

A : substrat 1 (\square) substrat 2 (\blacksquare),

B : éthanol (\blacktriangle), acide acétique (\blacktriangle), 4-éthylphénol (\square)



ANNEXE 22 : Profils de croissance, de consommation et de production de phénols volatils et de métabolites secondaires de la souche AWRI1608 en fonction du substrat carboné.

Les cultures ont été réalisées en milieu minimum et en conditions microaérobies, (agitation au moment des prélèvements)

Cultures simples :

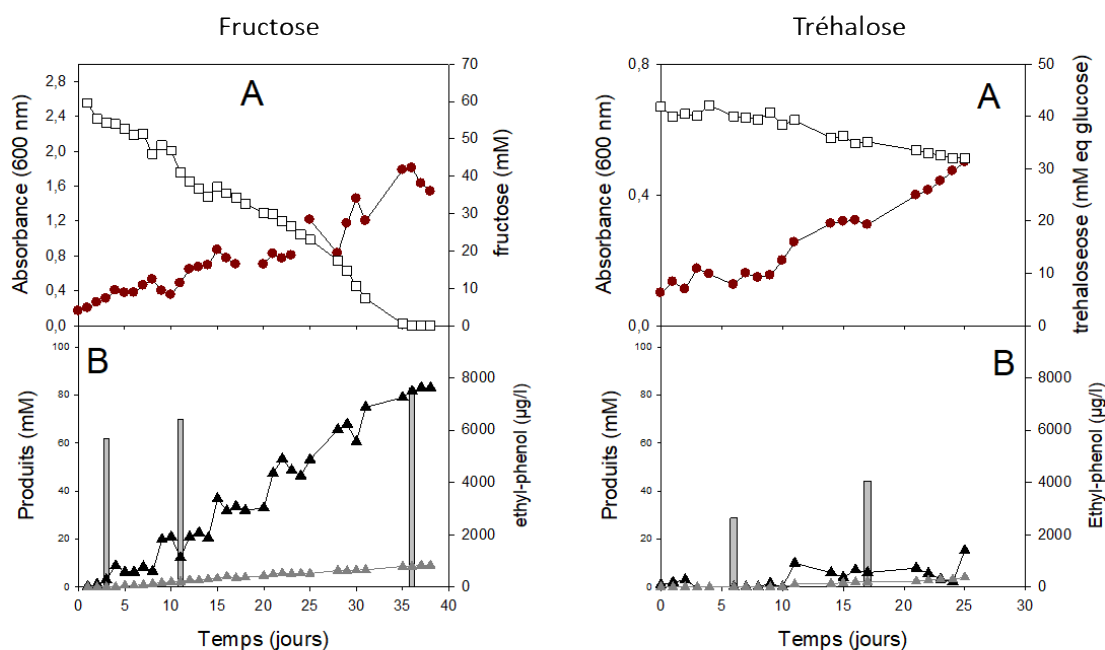
A : substrat (□), absorbance (●)

B : éthanol (▲), acide acétique (▲), 4-éthylphénol (■)

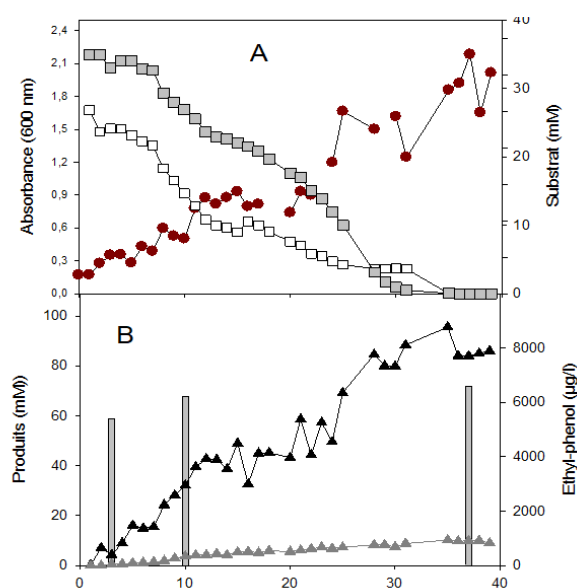
Culture en mélange :

A : substrat 1 (□) substrat 2 (■),

B : éthanol (▲), acide acétique (▲), 4-éthylphénol (■)



Glucose-Fructose



Valorisation des travaux de recherche

PUBLICATION DANS DES REVUES A COMITÉ DE LECTURE

Cibrario A., Peanne C., Lailheugue M., Campbell-Sills H., Dols-Lafargue M. Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. BMC Genomics, 2016, 17, 984.

Avramova, M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Schacherer J., Spano G., Capozzi V., Blaiotta G., Salin F., Dols-Lafargue M., Grbin P., Curtin C., Albertin W., Masneuf-Pomarede I. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports*, Soumis.

Albertin W., Avramova M., Cibrario A., Ballestra P., Dols-Lafargue M., Curtin C. Masneuf-Pomarède I. *Brettanomyces bruxellensis* : diversité génétique et sensibilité aux sulfites. Revue des Œnologues, 2016, **163**, 31-33.

COMMUNICATIONS ORALES

Avramova M., Cibrario A., Ballestra P., Albertin W., Dols-Lafargue M., Masneuf-Pomarède I. BrettDiagnosis: vers le développement de nouveaux outils diagnostic du risqué Brettanomyces. 13^{ème} Journée Technique du CIVB, Bordeaux (France), 14 février 2017.

Avramova M., Cibrario A., Coton M., Coton E., Salin F., Albertin W., Curtin C., Masneuf-Pomarède I. Why is the genetic diversity of *Brettanomyces bruxellensis* important for winemakers and is it related to sulphur tolerance. The Australian Wine Research Institute Technical Conference 2016, Adelaide (Australie), 24-28 juillet 2016

Cibrario A., Avramova M., Masneuf-Pomarède I., Albertin W., Ballestra P., de Revel G., Dols-Lafargue M. *Brettanomyces bruxellensis* intra-species genotypic and phenotypic diversity. Consequences on adaptation to wine. 12^{ème} conférence Levures : Modèles et Outils (LMO12), Bruxelles (Belgique), 13-15 avril 2016.

COMUNICATIONS AFFICHÉES

Cibrario A., Avramova M., Abdo H., Peltier E., Paulin M., Masneuf-Pomarède I., Ballestra P., de Revel G., Dols-Lafargue M. *Brettanomyces bruxellensis* intra-species phenotypic diversity and carbohydrate preferences. Consequences on adaptation to wine and spoilage ability. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33), Cork (Irlande), 26-29 juin 2017.

Avramova M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Salin F., Dols-Lafargue M., Albertin W., Curtin C., Masneuf-Pomarède I. The wine spoilage yeast species *Brettanomyces bruxellensis*: a diploid-triploid complex associated with contrasted sensibility to sulphites. 33rd International Specialised Symposium on Yeast (ISSY33), Cork (Irlande), 26-29 juin 2017.

Cibrario A., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Ballestra P., Dols-Lafargue M. The yeast species *Brettanomyces bruxellensis*: diversity and spoilage ability. Implications in the wine industry. Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Sante, Talence (France), 12 avril 2017.

Avramova M., Cibrario A., Salin F., Ballestra P., Dols-Lafargue M., Albertin W., Curtin C., Masneuf-Pomarède I. Tolérance aux sulphites de *Brettanomyces bruxellensis*: lien avec sa diversité génétique et diagnostic. 13^{ème} Journée Technique du CIVB, Bordeaux (France), 14 février 2017.

Cibrario A., Albertin W., Masneuf-Pomarède I., Ballestra P., Dols-Lafargue M. *Brettanomyces bruxellensis* intra-species genotypic diversity in the Bordeaux wine area. Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Sante, Arcachon (France), 6 avril 2016.

Cibrario A., Canac E., Dols-Lafargue M., Ballestra P. Carbohydrate metabolism of *Brettanomyces bruxellensis*. 10^{ème} Symposium International d'Œnologie de Bordeaux (Œno 2015), Bordeaux (France), 29 juin – 1^{er} juillet 2015.

Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*. Influence sur son potentiel d'altération des vins rouges.

Brettanomyces bruxellensis est une levure particulièrement redoutée des vinificateurs pour ses capacités d'altération organoleptique des vins. Elle est également associée à de nombreux produits fermentés et présente une importante diversité génétique en lien avec son origine écologique. L'analyse des profils microsatellites d'une collection importante d'individus (1318) d'origines géographiques variées montre une diversité génétique importante parmi les isolats de vin. Elle met notamment en évidence la coexistence d'individus diploïdes et triploïdes dans différentes régions du monde ainsi qu'à l'échelle d'un chai et d'un vin. La présence de certains génotypes dans plusieurs régions à travers le monde suggère la dispersion de cette espèce et une adaptation importante au milieu difficile qu'est le vin.

La relation entre diversité génétique, matrice d'origine et traits physiologiques a été explorée. La nature des sucres utilisables pour supporter la croissance ainsi que les capacités de production de phénols volatils sont peu variables entre les souches étudiées, indépendamment de leur niveau de ploïdie ou de leur origine écologique. Néanmoins, les profils de croissance et de production de phénols volatils (vitesses et rendements) varient et traduisent des différences dans l'adaptation des souches au milieu et aux conditions d'oxygénation. Nos données suggèrent notamment une adaptation plus importante des souches triploïdes aux conditions physico-chimiques du vin. D'un point de vue pratique, l'influence de certains facteurs physico-chimiques, tels que les sucres et la température, sur le développement de *B. bruxellensis* dans les vins a été étudiée. Dans les vins rouges, la composition en sucres résiduels ne peut pas être considérée comme un outil de diagnostic du risque « Brett ». Néanmoins, les variations importantes de température observées dans les chais, jusqu'alors sous-estimées, pourraient expliquer en partie les phénomènes d'altération de vins rouges fréquemment observés au cours du premier été d'élevage en barrique.

Mots Clés : *Brettanomyces bruxellensis*, vin, diversité génétique, métabolisme carboné, altération, adaptation.

***Brettanomyces bruxellensis* genetic and phenotypic intra-species diversity. Consequences on adaptation to red wine and spoilage ability.**

The yeast species *Brettanomyces bruxellensis* is the most dreaded wine spoilage microorganism because of its repercussions on wine organoleptic wine alteration. It is also present in numerous fermented beverages and its high genetic diversity is partly associated with its ecological origin. Microsatellite analysis of a large collection of isolates (1318) from various geographical origins shows the species' high genetic diversity, namely among wine strains. Notably, it highlights the coexistence of diploid and triploid individuals worldwide as well as at the region, winery and wine level. Isolation of some of the genotypes in several wine regions in the world suggests this species' dispersion as well as the putative adaptation of these individuals to the harsh wine environment.

The relationship between genetic diversity, matrix type, and physiological traits was further explored. The type of consumable sugars in relation to growth and phenol volatile production capacities of the studied strains, are independent from the ploidy level or ecological origin of the latter. Nevertheless, growth and phenol volatile production profiles (rates and yields) vary, highlighting differences in strains' growth capacity in different media and aeration conditions. In particular, our data suggests an important adaptation of triploid strains to wine-type environment. From a practical point of view, influence of physicochemical parameters (such as sugars and temperature) on *B. bruxellensis*' development in wine has been investigated. In red wine, residual sugar profiles don't seem to be a relevant tool to estimate the risk associated with "Brett" spoilage. However, the important temperature variations occurring in wine cellars could be a possible explanation for contamination frequency during the first summer of barrel-ageing.

Key words: *Brettanomyces bruxellensis*, wine, genetic diversity, carbon metabolism, alteration, adaptation.

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin
Unité de Recherche Œnologie EA 4577
USC 1366 INRA
33140 Villenave d'Ornon, France