



# FLASH INFO



## ***Nouvelles voies de diagnostics de la problématique Brettanomyces***

La problématique *Brettanomyces* reste toujours au centre de nos préoccupations. Ces dernières années force est de constater que les développements analytiques se sont concentrés sur les techniques de détection des populations : PCR, cytométrie... Au laboratoire EXCELL, nous disposons de chacune de ces techniques que nous tentons sans cesse d'améliorer pour tirer la quintessence de leurs spécificités. Mais nous pensons aussi que l'une des clefs du problème réside dans la compréhension du développement des *Brettanomyces*. Pourquoi les cellules se développent dans le vin ? Pourquoi produisent-elles des phénols volatils ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons différencié les facteurs propres aux milieux dans lesquels se développent les cellules, le raisin, le moût puis le vin de leurs environnements, la vigne et la cave. Concernant la cave, nous finançons et accompagnons la thèse de doctorat de Paul Le Montagner sur la compréhension des phénomènes d'adhésion des cellules de *Brettanomyces* aux surfaces (contenants, équipements...) et nous associons ces travaux relativement fondamentaux à des audits terrains que nos équipes de microbiologistes réalisent quotidiennement chez nos partenaires. Le début de ces travaux a déjà fait l'objet de quelques communications (Flash-info EXCELL, réunions SMARTLINK...). Nous y reviendrons plus précisément dans les mois à venir. Aussi, un article dédié à ces données a récemment été publié dans la revue [La Vigne](#).

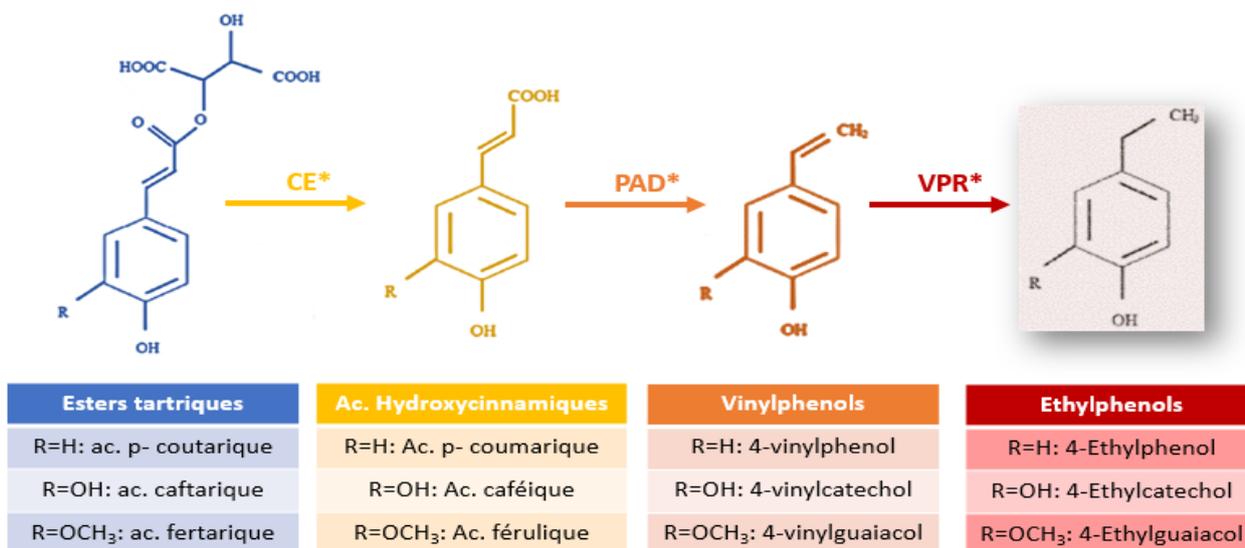
Pour ce qui est de la caractérisation du milieu, nous estimons qu'il est essentiel d'identifier ce qui favorise le développement des *Brettanomyces* pour cibler préventivement et prioritairement les lots sensibles. Si le couplage entre la croissance de la population de *Brettanomyces* et la production des phénols volatils fait encore débat auprès des microbiologistes du vin, il est néanmoins admis que les phénols volatils sont produits à partir des acides hydroxycinnamiques et que cette voie de conversion génère un peu d'énergie cellulaire à *Brettanomyces*. Elle demeure avant tout une voie de détoxification car les acides phénols sont relativement contraignants pour de nombreuses cellules. Cela constitue un des avantages adaptatifs dont a su tirer *Brettanomyces* dans le milieu vin. Les sucres sont de bien meilleurs substrats énergétiques pour les cellules microbiennes et là aussi *Brettanomyces* semble aussi posséder de nombreuses prérogatives. Certains sucres peuvent être apportés par les élevages sous bois. Ces données avaient fait l'objet d'une intervention de Pascal Chatonnet lors de 13<sup>ème</sup> matinée des œnologues de Bordeaux et [consultable ici](#).

Au laboratoire EXCELL, nous nous sommes également intéressés à un autre sucre : le tréhalose. Ce sucre en lien avec le déroulement de la fermentation et les comportements microbiens peut effectivement être utilisé par les cellules de *Brettanomyces* dans certaines conditions.

Afin de guider vers des diagnostics plus complets et plus préventifs, cet article détaille les voies analytiques possibles pour la caractérisation des acides hydroxycinnamiques et du tréhalose pour objectiver la probable vulnérabilité de certains lots face à *Brettanomyces*.

# 1. Les acides phénols et leurs formes estérifiées

La voie de biosynthèse des phénols volatils se découpe en trois étapes clefs : la dernière est la transformation des vinylphénols en éthylphénols sous l'action de vinylphénol réductases. Juste en amont, les vinylphénols auront été produits à partir des acides hydroxycinnamiques par action d'acide phénolique décarboxylases. Et jusqu'il y a peu nous nous arrêtons à ce stade en matière de dosage des composés. Mais les acides hydroxycinnamiques n'existent pas nativement sous forme libres, ils sont estérifiés. Le vrai précurseur du 4-éthylphénol n'est donc pas l'acide coumarique mais l'acide coutarique, idem pour le 4-éthylguaiacol et l'acide fertarique (figure 1).



\*CE=cinnamoyl esterase; PAD=Ac.Phenolique Decarboxylase; VPR= VinylPhenol Reductase

Figure 1 : Voies complètes de formation des éthylphénols.

De nombreux facteurs vont influencer les teneurs de l'acide coutarique et férulique : le stade de développement et de maturation des raisins, les stress rencontrés durant la campagne (stress hydrique, fongique...), les pratiques culturales... Il est établi que des différences sont notables entre les cépages, au sein d'un même cépage mais également avec les mêmes conditions culturales du matériel végétal (effet du porte-greffe, du clone...). Les teneurs et la cinétique de mise à disposition des formes libres dans le moût en fermentation sont fortement influencées par la date de vendange et les premières étapes œnologiques dédiées à l'extraction. En ce qui concerne le focus sur les activités cinnamoyl estérase, il a été recentré sur les préparations enzymatiques. Il est essentiel de bien considérer que cette activité enzymatique peut être le fait de nombreux microorganismes naturellement présents sur le raisin et dans le moût comme des moisissures et des bactéries. C'est aussi de ce fait certainement une des vertus oubliées du SO<sub>2</sub> que de bloquer les activités enzymatiques résiduelles lors de la libération des premiers jus.

Finalement, de nombreux facteurs peuvent influencer les teneurs en précurseurs des phénols volatils lorsque *Brettanomyces* entrera en action. La disponibilité récente du dosage de ces composés laisse entrevoir une nouvelle approche qui consisterait à diagnostiquer les facteurs susceptibles d'influencer les teneurs en précurseurs et de corrélés ces teneurs à la vulnérabilité de certaines pratiques et de certains lots.

Les dosages de la figure 2 ont été réalisés sur les raisins prélevés au vignoble juste avant les vendanges dans différentes parcelles d'une même priorité. Si *Brettanomyces* n'a pas été directement détectée sur ces échantillons de raisins et que la microflore semble, à ce stade, dominée par les levures non-*Saccharomyces*, il est intéressant de s'interroger si les échantillons B, C et E peuvent être ceux qui aboutiront aux vins les plus sensibles à *Brettanomyces* et si dans ce cas il n'est pas nécessaire de concentrer les suivis analytiques sur ces lots et aussi raisonner certaines pratiques de vinifications connues comme risquées et, préventivement également pour les années prochaines se demander ce qui a concouru à de telles différences.

	A	B	C	D	E		
Q-PCR <i>Brettanomyces</i> PCR quantitative LQ=1	Non détecté	Cell/mL					
Q-PCR <i>Torulaspota delbrueckii</i> PCR quantitative	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	Cell/mL
Q-PCR <i>Lachancea thermotolerans</i> PCR quantitative	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	Cell/mL
Q-PCR <i>Pichia kluyveri</i> PCR quantitative	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	Cell/mL
Q-PCR <i>Metschnikowia pulcherrima</i> PCR quantitative	<LQ	1.2 E+03	Non détecté	Non détecté	<LQ	<LQ	Cell/mL
Q-PCR <i>Metschnikowia fructicola</i> PCR quantitative	-	-	-	-	-	-	Cell/mL
Q-PCR <i>Hanseniaspora uvarum</i> PCR quantitative	1.0 E+06	4.7 E+05	3.1 E+05	2.2 E+05	1.0 E+05	4.0 E+05	Cell/mL
Acide caféique LC/MS	2.39	1.45	0.67	0.24	0.68	0.32	mg/kg
Acide coumarique LC/MS	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	mg/kg
Acide caftarique LC/MS	24.93	11.50	28.40	9.17	28.90	8.49	mg/kg
Acide férulique LC/MS	0.00	1.60	0.00	0.00	0.00	0.00	mg/kg
Acide coutarique LC/MS	3.21	12.18	12.41	5.65	12.63	5.08	mg/kg
Acide fertarique LC/MS	7.24	9.97	9.50	5.75	9.65	4.96	mg/kg

Figure 2 : Dosages des précurseurs des éthylphénols sur 6 échantillons issus de différentes parcelles d'une même propriété. Les résultats des précurseurs sont indiqués en mg/kg et les populations de levures en cellules par millilitre car les PCR sont réalisées sur eaux de lavage.

## 2. Le tréhalose, un sucre à analyser avec intérêt

Le tréhalose est un disaccharide de glucose dans lequel les deux glucoses sont reliés par une liaison  $\alpha, \alpha-1, 1$ . Cette dernière oriente la configuration des liaisons OH sur les cycles carbone du sucre de telle façon que la molécule de tréhalose constitue un remarquable bouclier pour les têtes polaires des phospholipides membranaires des cellules de levures. Le tréhalose est une molécule aux propriétés spécifiques produite pour protéger la cellule. En œnologie, les contraintes membranaires les plus fortes ont lieu en tout début d'itinéraire avec la forte pression osmotique du moût puis en fin de fermentation, lorsque l'éthanol, petite molécule amphiphile, va justement perturber l'organisation des phospholipides membranaires. Dans certaines conduites de macérations, ces contraintes peuvent être amplifiées par des températures remarquablement élevées.

En conditions de fermentations œnologiques, il est donc tout à fait possible que les populations de levures fermentaires contribuent à une production endogène de tréhalose. Or *Brettanomyces* présente la capacité de dégrader le tréhalose. Face à ces postulats, deux questions nous sont apparues : les niveaux de tréhalose dans les vins en fin de FA sont-ils significatifs et le cas échéant leurs évolutions sont-elles en lien avec les dynamiques de croissance de *Brettanomyces*. Pour cela, nous avons développé une méthode dosage du tréhalose par voie enzymatique. Cette analyse est en place au laboratoire depuis 18 mois. Cela nous a permis de cumuler quelques données présentées ci-après. Le graphique 3 est la synthèse des données obtenues sur des vins des millésimes 2019 et 2020. On constate des valeurs relativement significatives et très variables. Le graphique 4 est une confrontation à un instant T des teneurs en tréhalose et en phénols volatils dans différents vins. Les vins 14 et 15 sont ceux qui présentent les teneurs en phénols volatils les plus élevées et les résidus de tréhalose les plus faibles. Le tréhalose a-t-il donc été consommé pour participer au développement des *Brettanomyces* et à la production des phénols volatils ? Dans cette même logique doit-on considérer les teneurs élevées en tréhalose des vins 6, 9, 10, 11, 12 et 13 comme des signaux d'une sensibilité à venir des vins ? Aussi, des résultats (vins 4 et 7) brouillent quelque peu ces interprétations. La figure 5 apporte une partie des éléments de réponse à ces questions : dans un vin présentant environ autant de glucose que de tréhalose (autour du gramme de chacune de ces molécules), après une inoculation en *Brettanomyces*, les cellules consomment bien les trois sucres.

Figure 3 : Illustrations des concentrations en tréhalose retrouvées dans les vins des millésimes 2019 et 2020 analysés au laboratoire.

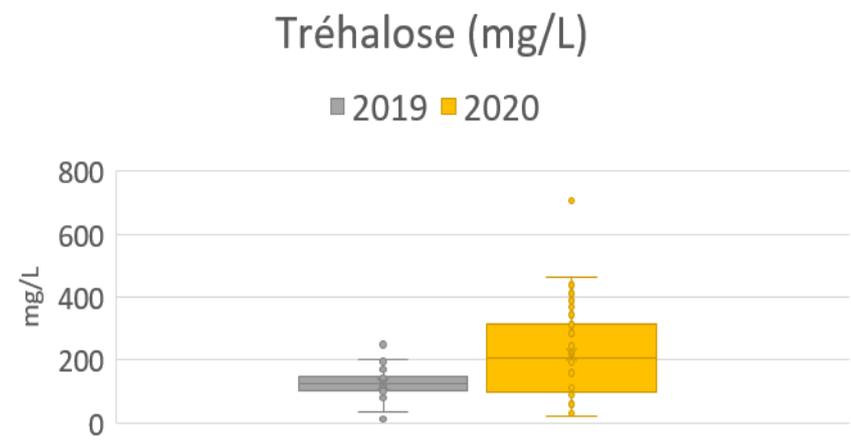


Figure 4 : Comparaison entre les valeurs de tréhalose et les teneurs en phénols volatils à un instant T de l'élevage des vins du millésime 2020 dans une propriété.

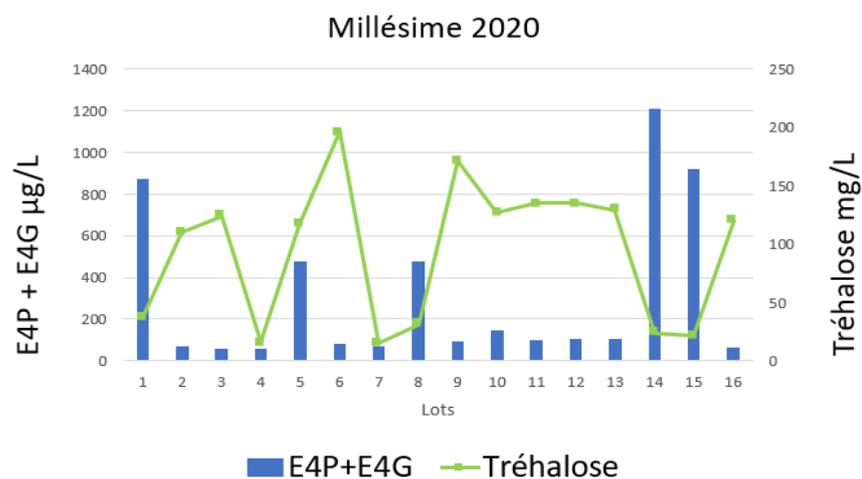
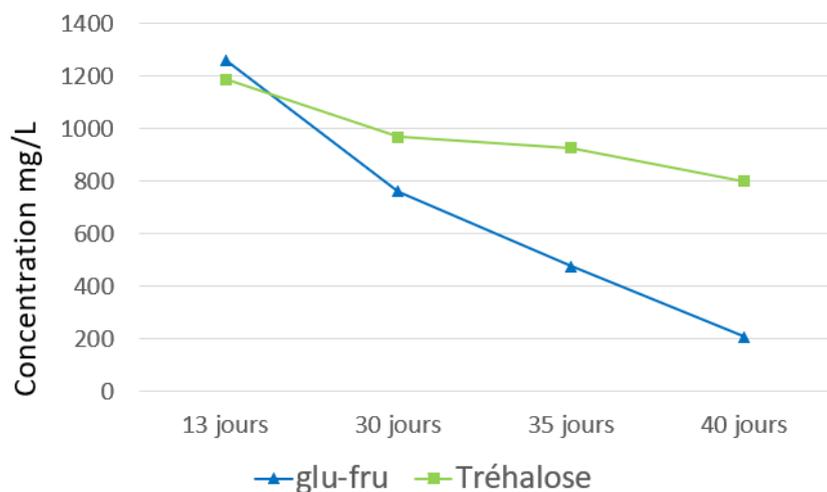


Figure 5 : Evolution de teneurs en glucose, fructose et tréhalose dans un vin inoculé en Brettanomyces.



## Conclusion

La stratégie « détecter et isoler » vaut certainement aussi pour la prévention contre le développement des *Brettanomyces* dans les vins. Pour la détection, plusieurs techniques de microbiologie existent et chacune a son intérêt. Cette stratégie trouve encore plus de sens lorsque les efforts sont centrés sur les « sujets à risque ». Pour cela, il nous a semblé opportun de réaliser des développements analytiques permettant de mieux appréhender certains paramètres. Ces développements peuvent ainsi nous aiguiller vers la vulnérabilité de certains lots : les acides phénols qui sont les précurseurs des phénols volatils et les sucres qui restent le carburant le plus bénéfique pour les cellules. En ce qui concerne les acides phénols, des développements récents réalisés au laboratoire en LC/MS permettent désormais de quantifier les formes estérifiées des acides coumarique et férulique et des formules analytiques sont désormais disponibles pour réaliser le dosage des composés seuls ou bien de disposer de l'ensemble des intermédiaires des chaînes métaboliques (avec donc en plus les vinylphénols et les éthylphénols). Concernant les sucres, les travaux entamés confirment l'intérêt du dosage du tréhalose. Ces analyses peuvent donc s'inscrire dans un screening global (y associant des paramètres incontournables comme les SO<sub>2</sub> libre, les teneurs en glucose et en fructose et l'acidité volatile) pour identifier les lots les plus risqués et éviter que les *Brettanomyces* ne s'y développent et qu'elles puissent ensuite se propager à l'ensemble de la production.

*Pour plus d'informations, veuillez contacter :*

- Zuriñe Rasines Perea, Responsable Chimie Fine : [zrasinesperea@labexcell.com](mailto:zrasinesperea@labexcell.com)
- Tommaso Nicolato, Responsable Oenologie & Agronomie : [tnicolato@labexcell.com](mailto:tnicolato@labexcell.com)
- Vincent Renouf, Directeur Général : [vrenouf@labexcell.com](mailto:vrenouf@labexcell.com)