Rôle des acides aminés dans la production d'amines biogènes chez Oenococcus oeni

Said Dandach

▶ **To cite this version:**

Said Dandach. Rôle des acides aminés dans la production d'amines biogènes chez Oenococcus oeni. Autre. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS020 . tel-01137754

HAL Id: tel-01137754
https://theses.hal.science/tel-01137754

Submitted on 31 Mar 2015

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.

Université de Bourgogne
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Jules Guyot)
UMR PAM Equipe VAlMiS (Vin Aliment Microbiologie, Stress)

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la Vie

par
Said DANDACH

le 8 avril 2013

Rôle des acides aminés dans la production d'amines biogènes chez *Oenococcus oeni*

Directrice de thèse

Michèle GUILLOUX-BENATIER

Membres du jury

F. Remize	Professeur, ESIROI - Université de la Réunion	Rapporteur
P. Cornea	Professeur, Université A.S.V.M. de Bucarest	Rapporteur
N. Rozès	Professeur, Université Rovira i Virgili	Examinateur
H. Alexandre	Professeur, Université de Bourgogne	Examinateur
M. Guilloux-Bénatier	Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de la Vigne et du Vin Jules Guyot à Dijon, au sein de l'équipe VAlMiS (Vin Aliment Microbiologie, Stress).

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Michèle GUILLOUX-BENATIER pour ses conseils et son soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie également Hervé ALEXANDRE pour m'avoir accueilli dans l'équipe du laboratoire VAlMiS et pour son soutien scientifique durant ces trois années.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Fabienne Remize, Professeur à l'Université de la Réunion, et Madame Petruta. Cornea, Professeur à l'Université A.S.V.M. de Bucarest, pour leur participation à mon jury de thèse en tant que rapporteurs.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Nicolas Rozès, Professeur à l'Université Rovira i Virgili, et Monsieur Hervé Alexandre, Professeur à l'Université de Bourgogne, d'avoir bien voulu être examinateurs de ce travail de thèse.

J'adresse également mes remerciements à tous les collègues du laboratoire et personnels de l'IUVV : Jordi Ballester et Christian Coelho pour la partie agmatine-vin et les étudiants de 2ème année du DNO pour la réalisation pratique, Vanessa, Magali, Maryse, Florian, Momo, Charlie, Mohammad, Nabil et tous les autres, trop nombreux pour tous les citer.

Je tiens à remercier mes parents Mawaheb et Mouhaid, mon frère Bachar et ma sœur Rima ainsi que mes amis proches, Emmanuelle, Ludo et Michel, pour leur soutien moral.

Pour terminer, je remercie Badia pour son soutien permanent, pour sa patience, son aide, et ses conseils qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Je dédie cette thèse à mon fils Rachad-Léo.

Sommaire

Introduction 1

Chapitre I - Synthèse bibliographique 3

1. Définition des amines biogènes 3

2. Amines biogènes et santé humaine 3

2.1. Effets des amines biogènes 3

2.2. Réglementation 5

3. Méthodes analytiques utilisées pour la quantification des amines biogènes 6

4. Présence des amines biogènes 7

4.1. Amines biogènes dans les végétaux 7

4.2. Amines biogènes dans les aliments 10

5. Formation des amines biogènes 18

5.1. Disponibilité des précurseurs 18

5.2. Présence des microorganismes décarboxylase-positifs 20

5.2.1. vis-à-vis de l'histidine 22

5.2.2. vis-à-vis de la tyrosine et de la phénylalanine 24

5.2.3. vis-à-vis de l'arginine 26

5.3. Conditions environnementales permettant la croissance bactérienne et l'activité enzymatique 29

5.3.1. Généralités 29

5.3.2. Conditions œnologiques 30

6. Dégradation des amines biogènes 33

7. Impact des amines biogènes sur le goût du vin 34

Chapitre II – Matériels et méthodes

1- Matériel biologique 36

1.1. Bactéries indigènes 36

1.2. Bactéries de laboratoire 36

2 - Identification des souches isolées 37

2.1. Morphologie et caractères biochimiques 37

2.2. Méthodes moléculaires 37

2.2.1. Extraction d'ADN 37

2.2.2. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis 38

3 - Milieux et conditions de culture 40

3.1. Isolement, repiquage, conservation 40

3.2. Milieu pour galerie API 50 CH 41

3.3. Milieu pour caractériser les auxotrophies vis-à-vis des acides aminés 41

3.4. Milieux pour évaluer la production d'amines biogènes 43

4 - Criblage des souches possédant des gènes codant pour des activités décarboxylases 46

5 - Caractérisation des auxotrophies vis-à-vis des acides aminés 49

6 - Mesure des activités enzymatiques 50

6.1. Préparation des extraits cellulaires 50

6.2. Dosage des protéines dans les extraits 51

6.3. Mesure des activités enzymatiques décarboxylases 51

7 - Dosage des amines biogènes et des acides aminés par HPLC 52

7.1. Appareillage 52

7.2. Dérivation au DEEMM 53

7.3. Analyse par HPLC 54

8 - Détermination de l'effet d'un ajout d'agmatine dans un vin sur la perception olfactive 55

8.1. Vins étudiés 55

8.2. Réactifs et concentrations étudiées 55

8.3. Panel de dégustateurs 56

8.4. Procédure expérimentale 56

8.4.1. Nécessité d'étudier l'effet de l'ajout d'ions sulfate 56

8.4.2. Protocole expérimental pour le sulfate d'ammonium et pour le sulfate d'agmatine 56

8.5. Conditions pratiques de réalisation 58

Chapitre III – Résultats 59

I - Relation entre auxotrophies vis-à-vis de 4 acides aminés précurseurs d'AB et production des AB correspondantes. 59

1 - Choix des souches bactériennes 59

1.1. Recherche de la présence des gènes d'intérêt 59

1.2. Croissance des souches en milieu LAC et MCD 62

1.3. Souches bactériennes retenues 63

2 - Auxotrophies vis-à-vis de 4 acides aminés précurseurs d'amines biogènes des 5 souches retenues. 64

3 - Capacité des souches à produire des amines biogènes 67

II - Effet du stress acide sur la production des amines biogènes par les souches de *O. oeni* 74

1. Production d'amines après croissance bactérienne en fonction de l'acidité de milieu 74

2. Production d'amines au cours de la survie bactérienne en milieu acide 83

III – Activités enzymatiques liées au métabolisme de l'arginine 86

1. Comparaison de la capacité des souches à dégrader l'arginine 86

2. Substrats préférentiels pour les souches 88

3. Activités enzymatiques mesurées au cours de la croissance cellulaire 90

IV - Effet de l'agmatine sur la perception olfactive du vin 93

1 - Effet d'une addition de sulfate dans le vin sur la perception olfactive 93

2 - Effet d'une addition d'agmatine dans le vin sur la perception olfactive 95

Conclusion 101

Références bibliographiques 105

Annexes 132

Annexe 1 : Composition et préparation des solutions mères du milieu MCD 132

Annexe 2 : Profil d'élution des acides aminés et des amines biogènes par RP-HPLC 133

Annexe 3 : Calcul de la quantité de sulfate d'ammonium à utiliser 134

Annexe 4 : Exemples de PCR obtenus pour les souches bactériennes isolées 135

Annexe 5 : Profils d'utilisation des sucres de quelques souches isolées 138

Annexe 6 : Publication soumise à Journal of Industrial Biotechnology and Microbiology 139

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 - Voies métaboliques de la biosynthèse des amines dans les bactéries. 21

Fig. 2 – Organisation génétique du locus *hdcA* de *L. hilgardii* 0006 23

Fig. 3 – Voies métaboliques de l'arginine chez les bactéries 26

Fig. 4 – Organisation du cluster *arc* 28

Fig. 5 - Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford. 51

Fig. 6 - Schéma d'un appareil de Chromatographie Liquide à Haute Performance 53

Fig. 7 – Evolution du pourcentage de solvant B lors de l'analyse par HPLC 54

Fig. 8 - Pourcentage d'erreur sur le dosage de l'agmatine en fonction de la concentration. 55

Fig. 9 - Questionnaire d'évaluation sensorielle. 57

Fig. 10 - Profils obtenus par 16S-ARDRA après digestion par *MseI* des 5 souches retenues pour notre étude après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. 64

Fig. 11 - Croissance bactérienne des 5 souches en milieu MCD avec omission de l'acide aminé indiqué. 65

Fig. 12 - Biomasses formées dans le milieu MCD (a) et le milieu vin (b) des 6 souches de *O. oeni* en fin de phase exponentielle de croissance 75

Fig. 13 - Capacité spécifique des souches à produire de l'agmatine (AGM) dans le milieu MCD (a) et dans le vin (b). 81

Fig. 14 - Viabilité cellulaire au cours du temps dans le vin à pH 3,5. 83

Fig. 15 – Utilisation de l'arginine par les 3 souches de *O. oeni* (7, 34 et B79). 88

Fig. 15 - Métabolisme de l'arginine par les 3 souches. 87

Fig. 16 – Croissance des 3 souches de *O. oeni* : 7 (a), 34 (b) et B79 (c) sur milieu LAC en fonction du temps (en heure) 90

Fig. 17 - Activités enzymatiques ADC et OTC au cours de la croissance des souches de *O. oeni* : 7 (a), 34 (b) et B79 (c). 91

Fig. 18 - Structures de la vanilline, de l’agmatine et des 2 isomères de la whisky-lactone. 97

Fig. 19 – Réaction de formation des bases de Schiff possibles de l’agmatine avec la vanilline 98

Fig. 20 – Spectres de fluorescence de la vanilline, de l’agmatine et de leur mélange en milieu hydro-alcoolique 99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Différentes méthodes de dosage des amines biogènes dans le vin. 6

Tableau II - Amines biogènes retrouvées dans les végétaux . 8

Tableau III - Amines biogènes présentes dans les produits alimentaires . 11

Tableau IV - Concentrations des amines biogènes dans la bière 12

Tableau V - Concentration des amines biogènes dans le vin rouge 13

Tableau VI - Concentration des amines biogènes dans le vin blanc 14

Tableau VII - Concentration des amines biogènes dans le vin rosé 15

Tableau VIII - Amines biogènes et acides aminés précurseurs 21

Tableau IX - Composition du milieu chimiquement défini (MCD). 42

Tableau X - Composition du vin après la fermentation alcoolique. 45

Tableau XI - Composition azotée du vin en fin de fermentation alcoolique 46

Tableau XII - Gènes à amplifier, amorces utilisées et tailles des bandes du produit de PCR. 47

Tableau XIII – Présence ou absence de gènes codant des enzymes impliquées dans la production d'amines biogènes 60

Tableau XIV - Souches capables de se multiplier sur MCD à pH 5,3. 63

Tableau XV - Comparaison des auxotrophies déterminées chez *O. oeni* dans différentes études pour 4 acides aminés. 66

Tableau XVI - Production d'amines biogènes par les 5 souches. 68

Tableau XVII - Relation entre auxotrophies vis à vis d'acides aminés précurseurs, présence des gènes et production de l'AB correspondante par les 5 souches. 69

Tableau XVIII - Production d'amines biogènes par les souches de *O. oeni* en milieu MCD. 76

Tableau XIX - Production d'amines biogènes par les souches de *O. oeni* en milieu vin. 77

Tableau XX - Disponibilité en précurseurs arginine et phénylalanine dans les 2 milieux. 78

Tableau XXI- Amines produites par les souches 7, 34 et B79 après 7 jours de survie dans le vin à pH 3,5. 84

Tableau XXII - Consommation d'arginine et production de métabolites par les souches de *O. oeni* (7, 34 et B79). 87

Tableau XXIII – Consommation des précurseurs et métabolites produits par les 3 souches de *O. oeni* (7, 34 et B79) après 3 h de réaction enzymatique 89

Tableau XXIV - Nombre de réponses correctes des tests triangulaires effectués pour étudier l'effet du sulfate sur la perception olfactive du vin. 94

Tableau XXV - Nombre de réponses correctes des tests triangulaires effectués pour étudier l'effet de l'agmatine sur la perception olfactive du vin. 95

Introduction

Au cours des dernières décennies, une plus grande attention est portée à la sécurité alimentaire afin de protéger la santé humaine que ce soit sur les contaminants chimiques, contaminants physiques ou contaminants d'origine biologique. Le secteur des aliments fermentés nécessite une attention particulière en raison de la complexité de leur processus de transformation biotechnologique. La recherche de contaminants d'origine naturelle et biologique tels que les amines biogènes est particulièrement importante, car certaines de ces molécules, notamment l'histamine, sont dangereuses pour l'homme si la dose ingérée est trop élevée.

Les amines biogènes sont des composés organiques azotés de faible poids moléculaire qui sont formées principalement suite à la décarboxylation par des microorganismes de certains acides aminés. Dans le vin, les amines biogènes les plus abondantes sont : la putrescine, l'histamine, la tyramine, la cadavérine et dans une moindre mesure la phényléthylamine. Certaines de ces amines sont déjà présentes dans le moût de raisin car synthétisées par la vigne mais la plupart d'entre elles sont produites et accumulées au cours de la vinification, par des levures pendant la fermentation alcoolique, et principalement par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique et surtout après celle-ci pendant l'élevage du vin. Leurs teneurs sont variables généralement de l'ordre de quelques milligrammes par litre dans le produit fini mais peuvent dans certains cas atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par litre.

Les travaux scientifiques menés actuellement sont conduits de manière à répondre à trois questions importantes : i) quel(s) microorganisme(s) est responsable de la présence des amines biogènes dans le produit fini ii) comment s'effectuent ces synthèses et iii) quel rôle jouent ces amines dans le métabolisme des microorganismes.

Le manuscrit est organisé en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur les amines biogènes et plus particulièrement celles retrouvées dans le vin.
Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des matériels et des méthodes qui ont été utilisés pour réaliser le travail.
Les résultats obtenus et leurs discussions sont présentés dans le troisième chapitre. Quatre parties sont proposées :

La première partie a consisté tout d'abord à isoler des souches bactériennes à partir de plusieurs vins rouges ayant effectué leur fermentation malolactique et caractérisés par des pH élevés. En effet, nous souhaitons avoir à notre disposition des bactéries indigènes appartenant aux différents genres rencontrés dans les vins (*Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus*) et des bactéries productrices d'amines puisque les souches sélectionnées sont peu ou pas productrices (absence dans leur génome de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse d'amines). Les souches isolées ont été caractérisées pour leurs auxotrophies vis-à-vis de quatre acides aminés précurseurs d'amines à savoir l'arginine, la tyrosine, l'histidine et la phénylalanine. Les relations entre l'auxotrophie vis-à-vis de l'acide aminé, la présence de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des amines et la production dans le milieu de l'amine correspondante ont été étudiées, l'objectif étant de savoir si une bactérie auxotrophe vis-à-vis d'un acide aminé précurseur d'une amine biogène et cultivée en présence de cet acide aminé produit plus de l'amine correspondante qu'une souche non auxotrophe.

La deuxième partie concerne l'étude de l'effet de l'acidité du milieu sur la production des amines biogènes pour les cinq souches bactériennes indigènes retenues appartenant toutes à l'espèce *Oenococcus oeni*.

La troisième partie concerne plus particulièrement les activités enzymatiques liées au métabolisme de l'arginine, compte tenu de la forte production d'agmatine observée dans les différents milieux de culture pour certaines souches de *Oenococcus oeni*,.

La quatrième partie est consacrée à l'étude de l'effet d'une addition croissante d'agmatine dans des vins issus de Pinot noir et de Chardonnay sur leur perception olfactive.

Enfin, dans la conclusion de ce manuscrit, nous revenons sur les principaux résultats que nous avons obtenus lors de cette thèse, et nous proposons des orientations pour continuer ce travail sur le plan scientifique.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. Définition des amines biogènes

Les amines biogènes (AB) sont des composés organiques d'origine biologique ayant un faible poids moléculaire. Elles existent sous différentes structures chimiques possédant au minimum un groupement aminé. La structure chimique peut être aliphatique (putrescine, cadavérine, agmatine, spermine, spermidine), aromatique (tyramine, 2-phényléthylamine) ou hétérocyclique (histamine sérotonine, tryptamine). Les amines biogènes peuvent aussi être classées en fonction du nombre de groupements aminés (NH_2) en monoamines (2-phényléthylamine, tyramine, tryptamine, histamine, sérotonine), en diamines (putrescine, spermine, spermidine, cadavérine) ainsi qu'en polyamines (agmatine). Elles sont formées ou dégradées par le métabolisme des animaux, des plantes et des microorganismes, c'est la raison pour laquelle on peut les retrouver dans les aliments. Elles sont produites principalement par décarboxylation des acides aminés par action de décarboxylases microbiennes, mais aussi par amination de cétones et aldéhydes ou par hydrolyse de composés azotés.

Les différentes amines sont : - Ethanolamine (C_2H_7NO) - Histamine (C_5H_9N3) - Méthylamine (CH_5N) - Sérotonine ($C_{10}H_{12}N_2O$) - Ethylamine (C_2H_7N) - Tyramine ($C_8H_{11}NO$) - Isopropylamine ou méthyléthylamine (C_3H_9N) - Propylamine (C_3H_9N) - Isobutylamine ($C_4H_{11}N$) - Butylamine ($C_4H_{11}N$) - Tryptamine ($C_{10}H_{12}N_2$) - Phényléthylamine ($C_8H_{11}N$) - Putrescine ou 1,4-diaminobutane ($C_4H_{12}N_2$) - 2-Méthylbutylamine ($C_5H_{13}N$) - 3- Méthylbutylamine ($C_5H_{13}N$) - Cadavérine ou 1,5-diaminopentane ($C_5H_{14}N_2$) - 1,6-Diaminohexane ($C_6H_{16}N_2$) - Hexylamine ($C_6H_{15}N$) - Agmatine ($C_5H_{14}N_4$) - Spermidine ($C_{14}H_{38}N_6$) - Spermine ($C_{10}H_{26}N_4$).

2. Amines biogènes et santé humaine

2.1. Effets des amines biogènes

Les AB jouent un rôle essentiel dans la physiologie et le développement de toutes les cellules vivantes : croissance, rénovation, métabolisme (Bardocz, 1995). Dans les végétaux, la putrescine, la spermidine et la spermine sont impliquées dans la division cellulaire, le développement et la réponse aux stress (Friedman *et al*., 1989 ; Tiburcio *et al.*, 1993). Chez l'homme, les AB sont impliquées dans l'activité du cerveau, la régulation de la température corporelle, la sécrétion

d'acide gastrique, la réponse immunitaire, les variations de pression sanguine (Ladero *et al.*, 2010). Il est donc important pour l'homme de maintenir un métabolisme normal pour une santé optimale et donc de réguler le pool intracellulaire de ces composés car ils ont à la fois un rôle positif de type antioxydants (Lagishetty et Naik, 2008) et un rôle négatif sur le développemnt de cancers par stimulation de la croissance cellulaire (Gerner et Meyskens, 2004).

Le pool de polyamines dans le corps humain provient de 3 sources : endogènes et biosynthèse *de novo*, microorganismes présents dans l'intestin et alimentation et c'est la troisième source qui apporte des quantités très largement supérieures à la byosynthèse endogène chez l'homme (Tabor et Tabor, 1984 ; Karovicova et Kohajdova, 2005). Chez des personnes saines, une teneur trop elevée en AB dans l'organisme pourra être diminuée sous l'action d'oxydases spécifiques (mono- ou di-oxydases), mais aussi par méthylation et acétylation (Taylor et Eitenmiller, 1986 ; Rao *et al.,* 1986). Par contre des personnes ayant de faibles activités oxydasiques vis-à-vis des amines seront alors sujettes à la toxicité des amines car l'ingestion d'aliments riches en AB modifie trop l'équilibre cellulaire et on retrouve rapidement ces composés dans l'intestin, le sang et dans un certain nombre d'organes. La gravité des symptômes varie en fonction de la quantité d'AB consommée : de simple nausées et migraines à des vomissements, diarrhées, éruption cutanée, arythmie cardiaque, brûlures buccales, hypotension (Morrow *et al.*, 1991). Les symptômes d'intoxications histaminiques sont les plus étudiés car ils pourraient concerner 1% de la population (Maintz et Novak, 2007). Ces symptômes résultent le plus souvent d'un déséquilibre entre l'histamine accumulée et la capacité à dégrader cette amine ; ils peuvent apparaître 2 h après l'ingestion de la nourriture, et l'empoisonnement dure habituellement 16 h avec souvent des symptômes neurologiques et cutanés. La tyramine et la 2-phényléthylamine ont été aussi reconnues comme des inducteurs possibles de migraines et de maux de tête sévères (McCabe-Sellers *et al.,* 2006). La putrescine et la cadavérine augmentent le potentiel toxique de l'histamine (Bjeldanes *et al.*, 1978).

Les amines biogènes sont aussi de potentiels précurseurs de composés N-nitroso carcinogènes car les fonctions amines secondaires peuvent former des nitrosamines par réaction avec des nitrites et les fonctions amines tertiaires produisent une gamme de produit N-nitrosés labiles (Karovicova et Kohajdova, 2005). L'éthanol augmenterait les effets indésirables des amines biogènes notamment par l'inhibition des amines oxydases (Maynard et Schenker, 1962) mais aussi en diminuant les jonctions intracellulaires et permettant ainsi un transit d'AB de l'alimentation vers le sang (Draper *et al.,* 1983). Toutefois, des tests cliniques avec des vins riches et pauvres en amines biogènes chez des sujets sains et sur des patients atteints d'urticaire chronique on été réalisés et ne

permettent pas d'incriminer les amines biogènes dans le cas d'intolérance au produit (Kanny *et al.*, 1999 ; Kanny *et al.*, 2001).

2.2. Réglementation

Le niveau toxicologique des AB est très difficile à établir car il dépend des caractéristiques individuelles. Aussi il n'existe pas aujourd'hui une limitation de la teneur en amines biogènes dans les aliments. Seule la teneur en histamine est réglementée par la législation européenne (Règlement CE N° 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005). Pour les produits de la pêche, la teneur est fixée entre 100 et 200 $mg.Kg^{-1}$ et pour les produits de la pêche ayant subit un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, entre 200 et 400 $mg.Kg^{-1}$; ceci concerne les produits fabriqués à partir d'espèces de poissons associées à une grande quantité d'histidine appartenant aux familles *Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae* et *Scombresosidae*. Aucune réglementation n'existe actuellement pour le vin. Néamoins lors de l'exportation, les acheteurs peuvent imposer des teneurs maximales aux fournisseurs de vins. Seule, la Suisse avait fixé un seuil maximum d'histamine dans le vin de 10 $mg.L^{-1}$ mais elle vient de supprimer cette limite légale d'importation. L'Organisation Internationale de la vigne et du Vin (OIV) a travaillé très récemment à l'établissement d'un « *Code des bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la présence d'amines biogènes dans les vins* » qui est paru en 2011.

Mais, des amines biogènes sont parfois présentes en plus grande quantités que l'histamine dans les produits fermentés comme le fromage, ou dans les produits fumés comme la charcuterie ou la choucroute. Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, 2011), il n'y aurait pas d'effets néfastes sur la santé humaine après une exposition aux doses suivantes (par personne et par repas) :

i) 25 à 50 mg d'histamine pour les personnes en bonne santé, pour les personnes intolérantes à l'histamine seuls des niveaux inférieurs aux limites détectables peuvent être considérés comme sains;

ii) 600 mg de tyramine pour les personnes en bonne santé qui ne prennent pas des médicaments qui inhibent la monoamine oxydase et entre 6 et 50 mg pour ceux qui prennent ces médicaments;

iii) pas de doses limites pour la putrescine et la cadavérine car les informations sont insuffisantes.

3. Méthodes analytiques utilisées pour la quantification des AB

Le dosage des AB dans le vin est difficile pour les deux raisons suivantes : (i) le vin est considéré comme une matrice complexe, (ii) les AB sont souvent présentes en faibles concentrations voire à l'état de traces. Différentes méthodes ont cependant été appliquées au vin (Tableau I).

Tableau I - Différentes méthodes de dosage des AB dans le vin.

Méthodes de dosage	Références
- Méthode immuno-enzymatique (ELISA) pour HIM	Marcobal *et al.* (2005)
- Chromatographie sur couche mince (TLC)	Romano *et al.* (2012)
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	Buteau *et al.* (1984) Bauza *et al*. (1995a) Soleas *et al.* (1999) Sass-Kiss *et al.* (2000) Herbert *et al.* (2001) Vidal-Carou *et al.* (2003) Busto *et al*. (1996) Alberto *et al.* (2002) Hernández-Orte *et al.* (2006). Gómez-Alonso *et al.* (2007) Garcia-Villar *et al.* (2006-2009) Souffleros *et al.* (2007) Yildirim *et al.* (2007) Proestos *et al.* (2008) Lehtonen (1996)
- Electrophorese capillaire (CE)	Kvasnicka et Voldrich (2006)
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	Fernandes et Ferreira (2000)
- Chromatographie liquide couplée à l'electrospray ionisation ion trap (LC-MS)	Millan *et al.* (2007)
- Nano-chromatographie liquide	Hernandez-Borgès *et al.* (2007)
- Trap ion versus Spectromètrie de masse en temps de vol couplée à Electrophorèse capillaire	Simo *et al.* (2008)

Parmi les méthodes de dosage citées dans le tableau ci-dessus, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la plus utilisée pour analyser les AB dans le vin comme pour les aliments (Önal, 2006).

Les différences entre les techniques utilisées par les auteurs portent :

- sur l'agent dérivant : 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, o-phthaldialdéhyde, chlorure de dansyl, AQC, FMOC pour les plus courants et 8-phenyl-(4-oxy-acetic acid N-hydroxysuccinimide ester)-4, 4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (ou THPAB-OSu) qui vient d'être synthétisé et testé avec succès par Li *et al.* (2006). Certains auteurs utilisent plusieurs agents dérivants : OPA, 3-MPA, FMOC-Cl pour doser à la fois 10 amines et 22 acides aminés par HPLC (Herbert *et al.*, 2001).

- sur la détection : mesure en UV, par fluorescence, par spectrométrie de masse, ou par combinaison de différentes techniques. De Borba et Rohrer (2007) proposent ainsi des détections par suppression de conductivité, ampérométrie intégrée pulsée, UV ensemble ou en combinaison.

- sur le type de colone utilisée (ODS-Hypersil, Nova-Pak C_{18}, $C_{18\ \mu}$Bondapak, Inertsil ODS-3 RP18, Luna C18, Bondclone C_{18} …).

- sur le moment de la dérivation avant ou après passage sur colonne, avec de la ninhydrine pour Csomos et Sirnon-Sarkadi (2002) et du 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate pour Hlabangana *et al*. (2006).

4. Présence des amines biogènes

On peut trouver les AB dans les végétaux, les aliments, et les boissons fermentées.

4.1. Amines biogènes dans les végétaux

Plusieurs végétaux, tels que les oranges, les framboises, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les fraises et les raisins contiennent différentes amines biogènes avec des concentrations variables (Maxa et Brandes, 1993). Le tableau II explicite le type d'AB trouvées dans différents produits d'origine végétale.

Tableau II - Amines biogènes retrouvées dans les végétaux (d'après Halász *et al.*, 1994).

Produits d'origine végétale	Amines biogènes
Oranges	noradrénaline, tryptamine,
Tomates	tyramine, tryptamine, histamine
Bananes	tyramine, noradrénaline, tryptamine, sérotonine
Prunes	tyramine, noradrénaline
Epinards	histamine
Fèves de cacao	phényléthylamine

Dans le but de construire une banque de données des polyamines dans l'alimentation, Ali *et al.* (2011) ont récemment répertorié les végétaux contenant de la putrescine, de la spermidine et de la spermine. Ces dernières sont effectivement retrouvées dans de nombreux végétaux : la pomme de terre, le chou-fleur, le chou, les épinards, le céleri, la betterave, la carotte, le concombre, la tomate, les oignons, les asperges… mais aussi dans de nombreux fruits : prune, poire, pèche, orange, banane… . Les teneurs sont très variables selon les produits considérés. Ces auteurs montrent ainsi que les jus de raisin frais apparaissent à la première place dans l'apport de putrescine avec 19,6 mg/portion devant les jus d'orange avec 17 mg/portion et la choucroute avec 14,6 mg/portion.

La vigne contient des amines et notamment la putrescine, la spermine et la spermidine. Ces amines jouent un rôle dans la régulation de la plante et sont trouvées à tous les stades du développement de la baie de raisin et de la vigne (Broquedis *et al.*, 1989). La quantité de putrescine dans le raisin permet en fait de distinguer un état adulte d'un état juvénile chez des plants de *Vitis vinifera* (Chardonnay et Pinot noir) cultivés en conditions contrôlées. C'est un marqueur de rajeunissement au vignoble (Heloir, 1998).

Différents paramètres influencent les concentrations en amines du raisin :

a) La variété

Le cépage Tempranillo est plus riche en histamine et tyramine et moins riche en putrescine et cadavérine que le cépage Cabernet Sauvignon (Hernandez-Orte *et al.*, 2006). Souffleros *et al.* (2007) montrent aussi que les cépages peuvent influencer les teneurs en amines des vins ; en rouge, le Mantilaria et la Syrah donnent les concentrations les plus élévées en amines par rapport

aux 9 cépages testés et en blanc c'est la même chose pour le Muscat d'Alexandrie, le Roditis et le Asyrtiko par rapport aux 8 cépages testés. Herbert *et al.* (2005) montrent également que la variété cultivée influence beaucoup la teneur en acide aminés des moûts et donc la richesse finale en AB du vin.

En blanc, le cépage Hárslevelü apparait différent des cépages Furmint, Ottonel et Muscat en ce qui concerne les teneurs retrouvées en spermine, tyramine et histamine (Sass-Kiss *et al.*, 2000). Soleas *et al.* (1999) étudient la teneur en AB de vins, tous ensemencés avec des levures sélectionnées, et issus de différents cépages dans une même region de production (Ontario) et trouvent alors des différences significatives. Le Pinot noir et le Chardonnay donnent des vins plus riches en AB que les autres variétés même si les teneurs obtenues restent parfaitement acceptables d'un point de vue sanitaire.

b) La maturation du raisin

Les teneurs en putrescine, spermine, spermidine et agmatine diminuent au cours de la maturation car elles deviennent de moins en moins essentielles pour le développement de la plante ; ceci se traduit alors par des niveaux d'amines dans les baies mûres très faibles : entre 12-25 mg/kg pour la putrescine, 18 mg/kg pour la spermidine, 6-7 mg/kg pour la spermine dans la pulpe de Grenache et Syrah (Bauza *et al.*, 2007).

c) les facteurs environnementaux

Pour Bover-Cid *et al.* (2006), des grappes de Cabernet Sauvignon soumises à différentes stress hydriques ne présentent pas de différence significative dans les teneurs en putrescine mesurées : 5,19 mg/L dans le moût pour le lot n'ayant pas subi de stress hydrique et caractérisé par une évapotranspiration potentielle (ETP) de 80%, 5,27 pour une ETP de 65%, 5,58 pour une ETP de 35% et 5,64 pour le stress hydrique maximal (ETP = 0%).

La localisation géographique jouerait un rôle. Le Cabernet Sauvignon cultivé en Californie apparaît beaucoup plus riche en putrescine, histamine, tyramine et spermidine que celui d'Australie (de Borba et Rohrer, 2007). Par contre, Anli *et al.*, (2004) ne trouvent pas de différences et d'interactions significatives lorsqu'ils comparent les teneurs en amines quantifiées pour des vins produits dans différentes régions de Turquie. Vigentini *et al.* (2009) insistent aussi plus sur l'effet millésime que sur l'espace géographique de culture de la vigne.

d) le devéloppement des champignons sur les raisins

Kiss *et al.* (2006) montrent que des différences significatives sont notées lorsque l'on compare la composition en amines de raisins sains, de raisins botrytisés ou de raisins infectés par *Penicillium* (pourriture grise ou verte). Les baies saines contiennent principalement de la putrescine et de la spermine. Les baies infectées par *Botrytis cinerea* contiennent en outre de la tyramine, de l'agmatine, de l'isomylamine et des quantités plus élevées en histamine et spermidine. Lorsque le *Penicillium* se développe sur les raisins, la teneur en agmatine reste faible, mais les teneurs en putrescine, spermidine et phényléthylamine augmentent beaucoup. Les microorganismes présents sur le raisin synthétisent en fait ces amines au cours de leur développement (Sass-Kiss *et al.*, 2000).

La quantification des amines dans les vins issus des raisins botrytisés permet même de les distinguer des vins issus de raisin sains mais aussi selon leur origine géographique : les Tokaji Aszu se différencient nettement des vins liquoreux étrangers élaborés eux aussi par pourriture noble (Kiss et Sass-Kiss, 2005). Csomos et Simon-Sarkadi (2002) trouvent ainsi des teneurs en AB totales de 15 à 29 mg/L pour les vins Aszu et seulement 4 à 20 mg/L pour les vins doux.

4.2. Amines biogènes dans les aliments

Dans les aliments non fermentés, la présence des amines biogènes au dessus d'un certain seuil est considérée comme un indice d'une activité microbienne indésirable. Toutefois, la présence des AB dans les aliments n'est pas nécessairement due à la croissance d'organismes d'altération, parce qu'ils ne sont pas tous décarboxylase-positifs. La concentration de l'histamine, de la putrescine et de la cadavérine augmente généralement au cours d'altération du poisson et de la viande, alors que celle de la spermine et de la spermidine baisse au cours de ce processus (Ten Brink *et al*., 1990). La famille des poissons Scombridés sont les plus associées à des cas d'intoxication histaminique (scombrotoxicosis). D'autres amines biogènes ont été également trouvées chez les poissons ; on distingue alors la putrescine, la cadavérine, la tyramine, l'histamine, l'agmatine, la spermine, et la spermidine.

Après les poissons, les fromages sont les produits alimentaires fermentés les plus souvent associés à l'empoisonnement histaminique. De nombreuses études ont été menées pour déterminer la teneur en amines dans les fromages. Une variété d'amines, telles que l'histamine, la tyramine, la

cadavérine, la putrescine, la tryptamine la spermidine et la spermine ont été trouvées dans le fromage (Standarová *et al.,* 2010). Pour Ali *et al.* (2011), les fruits et les fromages contiennent les valeurs les plus élevées en putrescine alors que les végétaux et les viandes sont les plus riches en spermine et spermidine. Les différentes amines biogènes présentes dans les produits alimentaires sont listées dans le tableau III.

Tableau III - Amines biogènes présentes dans les produits alimentaires (d'après Brillet, 2005).

Produits alimentaires	Amines biogènes
Produits laitiers	
lait, yaourt	spermine, spermidine
fromage	tyramine, histamine, putrescine, cadavérine, tryptamine, phényléthylamine
Produits carnés	
porc frais	tyramine, phényléthylamine, cadavérine, putrescine, histamine, spermine, spermidine, putrescine, tyramine, tryptamine,
saucisson	histamine, cadavérine, phényléthylamine, spermine, spermidine
boeuf frais ou haché	tyramine, putrescine, histamine, cadavérine, tryptamine
Produits marins	
poissons : saumon frais et fumé,	histamine, tyramine, putrescine
truite, bar, thon, cabillaud, dorade, merlu, sardine …	cadavérine, agmatine, tryptamine, phényléthylamine, spermidine, spermine, triméthylamine
calmar	agmatine, putrescine, cadavérine, tyramine, histamine
crevettes	putrescine, cadavérine

4.3. Amines biogènes dans les boissons fermentées

Parmi les boissons fermentées, la bière présente un facteur de risque important pour la santé humaine, car certaines des AB sont produites en quantités considérables lors des processus

fermentaires (Cortacero-Ramírez *et al.*, 2007). La teneur en AB dans la bière provenant de différents pays a été étudiée par Kalac et Krízek (2003). Le résultat de cette étude est présenté dans le tableau IV.

Tableau IV- Concentrations des AB dans la bière (d'après Kalac et Krízek, 2003)

Amine biogène	concentration en $mg.L^{-1}$
Histamine	0,2 – 21
Tyramine	<0,3 – 67,5
Putrescine	<0,3 – 30,7
Spermidine	<0,2 – 6,8
Spermine	<0,2 – 15,2
Cadavérine	<0,2 – 49,1
Tryptamine	0 – 10,1
Phényléthylamine	<0,2 – 8,3
Agmatine	0,5 – 46,8

Ces mêmes auteurs rapportent que la teneur en amines est fonction de la matière première et du procédé de brassage. Une contamination microbienne au cours du processus de brassage peut modifier beaucoup la teneur en AB. Une attention toute particulière doit être portée à la contamination par des espèces de *Pediococcus* (Isquierdo-Pulido *et al.*, 2000).

D'autres boissons fermentées sont actuellement contrôlées au niveau des teneurs en amines. Le cidre est élaboré à partir d'un fruit riche en amines et il subit un processus fermentaire. Pourtant sur 66 échantillons, Garai-Ibabe *et al.* (2012) montrent que le pressurage et le process de fabrication n'influencent pas les niveaux de la seule amine retrouvée (PUT) mais insistent sur la nécessité de stérilisation microbiologique du produit pour éviter des apparitions d'AB en bouteilles. Des produits fermentés à base de riz sont aussi étudiés (Kim *et al.*, 2011 ; Zhong *et al.*, 2012) car ils contiennent notamment de la tyramine, de la sérotonine, de l'histamine et de la putrescine.

De nombreux travaux ont été réalisés sur le vin. Une synthèse non exhaustive de différentes études est reportée dans les tableaux suivants : tableau V pour les vins rouges, tableau VI pour les vins blancs et tableau VII pour les vins rosés.

Tableau V - Concentration des amines biogènes dans le vin rouge en $mg.L^{-1}$.

Pays	ETA	HIM	PUT	CAD	TYM	TRP	PHM	ETM	MEM	ISM	AGM	SER	SPD	SPM	Références
Australie (1)	-	0,45	5,2	0,35	-	-	-	-	-	-	Nd	-	nd	nd	De Borba *et al.* (2007)
Chine (38)	-	nd - 10,5	0,19 - 13,06	nd – 13	nd - 19,1	nd	nd - 4,58	-	-	-	-	-	nd - 3,82	nd - 2,64	Li *et al.* (2007)
Espagne (18)	-	0,55 - 11,95	3,92 - 15,35	0,35 - 0,8	0,47 - 2,63	0,03 - 0,07	nd - 0,06	-	-	nd - 0,02	nd - 1,07	-	1,91 - 3,84	-	Gómez-Alonso *et al.* (2007)
Espagne (27)	-	nd - 19,6	3,7 - 99,9	nd – 1	nd - 18,2	nd - 4,7	nd - 1,4	-	-	-	nd - 3,2	nd - 0,7	nd - 2,64	nd	Bover-Cid *et al.* (2006)
Espagne (11)	-	0,8 - 12,2	10,5 - 15,37	1,9 - 14,1	-	<0,02 - 0,66	0,06 - 5,15	-	-	-	-	<0,22 - 0,5	-	-	García-Villar *et al*. (2006)
Espagne (2)	-	3,69 - 4,57	6,94 - 16,11	0,82 - 1,35	0,68 - 0,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hernández-Orte *et al.* (2006)
Espagne (9)	14,8 - 27,8	nd - 21,6	nd - 69,1	-	7 - 59,7	-	nd - 4,8	1,2 - 7,8	-	-	nd - 6,7	-	-	-	Hlabangana *et al.* (2006)
Espagne (3)	-	17,6 - 25,2	31,8 - 83,2	4,1 – 7	13,8 – 20	-	5,6 - 7,3	-	-	-	-	-	-	-	Simó *et al*. (2008)
Espagne (100)	-	0,40 - 8,22	0,06 - 13	0,07 - 0,68	0,03 - 3,20	0.04 - 0.98	0.09 - 4.02	-	-	-	-	-	0.08 - 1.10	0	Millán *et al.* (2007)
Espagne (61)	-	0 - 10,77	0 - 26,54	0 - 3,15	0 - 11,32	-	0–2,24	0 - 3,55	0 – 1,78	-	-	-	-	-	Marcobal *et al.* (2005)
Espagne (36)	-	0,2 - 10,21	5,28 - 44,35	0,82- 30,39	-	0,008 - 1,78	0,006 - 7,11	-	-	-	-	0,07 - 3,04	-	-	García-Villar *et al.* (2007)
Espagne (36)	-	nd - 5,5	nd - 25	nd - 12,4	nd - 4,3	-	nd - 1,8	nd	nd	-	-	-	-	-	Moreno-Arribas et Carmen Polo (2008)
Espagne (6)	-	nd - 4,74	4,67 - 19,19	nd - 3,15	nd - 5,91	nd	nd	-	-	-	-	-	nd	nd - 0,57	Romero *et al.* (2002)
Espagne (103)	-	2,4 - 8,2	7,5 - 47,3	<0,5	1,8 - 2,3	<0,5	0,8 - 1	-	-	-	-	-	-	-	Landete *et al.* (2005b)
Espagne (8)	-	2,38 - 15,9	4,8 - 45	0,07 - 0,46	2,2 - 9,3	-	0,07 - 1,26	-	-	-	-	-	-	-	García-Villar *et al.* (2009)
Espagne (32)	-	0,51 - 15,7	3,75 - 23,5	0,33 - 0,9	0,26 - 2,63	0,02 - 0,08	0,008 - 0,06	-	-	0,004 -0,02	0 - 1,15	-	1,85 - 4,24	-	Izquierdo Canãs *et al.* (2008)
Espagne (44)	nd - 3,24	0,66 - 13,5	nd - 5,04	nd - 0,71	nd	-	-	nd - 5,68	0,41 - 1,17	nd - 0,79	-	-	-	-	Busto *et al.* (1996)
Etats-Unis (1)	-	4,9	16.1	0.35	2.6	-	-	-	-	-	nd	-	1,7	nd	De Borba *et al.* (2007)
France (485)	-	2,6-8,7	7,1-34,3	0,5-1,2	2,3-10,6	-	0,1-0,3	1,2-6,8	0,1-0,3	0,1-0,4	-	-	-	-	Marchand *et al.* (2012)
France (54)	-	3,7	10,8	0,2	3,7	-	1,9	-	-	-	21,6	-	0,6	0,1	Bauza *et al*. (1995a)
Grèce (15)	nd - 0,71	0,98 - 1,65	nd - 2,7	nd - 0,21	nd - 0,46	nd - 1,32	-	-	nd – 0,59	nd - 0,95	nd - 0,63	-	-	-	Proestos *et al*. (2008)
Grèce (45)	-	nd - 2,11	nd - 5,23	nd - 3,21	nd - 3,65	-	nd - 8,15	nd - 1,61	nd – 0,66	nd - 8,17	-	-	nd - 1,56	nd - 1,62	Soufleros *et al.* (2007)
Italie (3)	-	2,18–8,93	5,56 - 22,5	0–0,378	2,52–15	nd	0,92 - 3,04	13,5 - 18,2	nd – 0,125	-	-	-	0–20,1	0,63–1,86	Hernández-Borges *et al. (*2007)
Portugal (17)	11,1 - 27,3	6,1 - 15,2	1,3 - 27,2	0,6 - 2,7	nd - 6	<0,35 - 0,9	nd - <0,47	0,4 - 8,7	nd – 3,2	nd - 0,6	-	-	-	-	Herbert *et al*. (2001)
Turquie (30)	-	nd - 1,96	nd - 5,92	nd - 3,94	nd - 0,23	nd - 7,94	nd - 3,87	-	-	-	nd - 18,18	-	nd - 2,19	nd - 1,75	Anli *et al.* (2004)
Turquie (8)	-	nd - 3,14	2,39 - 6,28	nd - 0,49	nd - 1,42	nd - 0,16	-	0,22 - 1,03	0,23 - 1,15	-	nd - 3,31	-	-	-	Yildirim *et al.* (2007)
Chili (50)	-	0,37 - 15,85	5,76 - 34,45	1,36 - 5,21	0,37 - 6,31	-	nd - 2,5	-	-	-	-	-	1,93 - 7,22	0,63 - 2,15	Henriquez-Aedo *et al.* (2012)

Ethanolamine (ETA), histamine (HIM), putrescine (PUT), cadavérine (CAD), tyramine (TYM), tryptamine (TRP), phényléthylamine (PHM), éthylamine (ETM), méthylamine (MEM), isoamylamine (ISM), agmatine (AGM), spermidine (SPD), spermine (SPM), sérotonine (SER)

nd = non détecté ; tr = traces ; (n) = nombre de vins analysés

Tableau VI - Concentration des amines biogènes dans le vin blanc en $mg.L^{-1}$.

Pays	ETA	HIM	PUT	CAD	TYM	TRP	PHM	ETM	MEM	ISM	AGM	SER	SPD	SPM	Références
Turquie (2)		nd	3,22 - 5,99	nd	nd	nd	-	0,24 - 1,25	0,18 - 0,29	-	nd		-	-	Yildirim *et al.* (2007)
Espagne (14)		nd - 0,67	3,88 - 18,43	0,15 - 0,33	nd - 5,48	nd - 0,27	nd - 0,09	-	-	0 - 0,15	0,44 - 1,07		0,27 - 2,35	-	Gómez-Alonso *et al.* (2007)
Espagne (10)		nd - 1,1	2,1 – 9,7	nd - 0,6	nd - 2,3	nd	nd - 1,7	-	-	-	nd	nd - 0,6	nd - 1,5	nd	Bover-Cid *et al.* (2006)
Espagne (1)		0,4	4,4	5,1	0,3	-	0,2	-	-	-	-		-	-	Simó *et al.* (2008)
Espagne (6)		nd - 2,85	1,48 - 12,61	nd - 1,16	nd - 1,44	nd	nd	-	-	-	-		nd	nd	Romero *et al.* (2002)
Espagne (14)	nd - 0,15	nd - 3,46	1,93 - 3,88	nd - 1,43	nd - 0,33	-	-	nd - 0,6	nd - 1,21	0,26 - 0,82	-		-	-	Busto *et al.* (1996)
France (15)		0,1	1,9	0,1	2,2	-	0,9	-	-	-	10,3		0,3	0,1	Bauza *et al.* (1995a)
Grèce (17)	nd - 0,17	0,18 - 1,13	nd - 9,07	nd - 0,13	nd - 1,16	nd - 0,51	-	-	nd - 0,49	0,46 - 2,41	nd		-	-	Proestos *et al.* (2008)
Grèce (47)		nd - 5,95	nd - 3,22	nd - 4,44	nd - 2,54		nd - 7,82	nd - 1,96	nd - 2	nd - 4,63	-		nd - 1,26	nd - 4,85	Soufleros *et al.* (2007)
Hongrie (11)		0,81 - 2,82	0,67 - 2,11	0 - 0,31	11,32 - 22,45	-	-	-	-	-	0,48 - 1,11		0,45 - 0,81	-	Csomos et Simon-Sarkadi (2002)
Italie (3)		1,45–1,97	1,83 - 2,23	0–0,20	0,67–1,14	nd	0,99 - 1,19	4,66 - 7	nd	-	-		0–10,4	0,62–1,58	Hernández-Borges *et al.* (2007)
Portugal (16)	11,1 - 22,3	5,1 - 16,5	1 - 7,6	<0,17 - 1,1	nd - 4	<0,35 - 0,6	nd - <0,47	<0,24 - 3,2	0,2 - 1,8	nd - 0,8	-		-	-	Herbert *et al.* (2001)
Chili (10)		0,51 - 2,91	1,51 - 12,86	0,07 - 0,84	nd - 0,42		tr - 2,05						tr - 3,69	0,12 - 0,16	Henriquez-Aedo *et al.* (2012)
Hongrie (32)		0,07 - 0,21	1,09 - 8,72	0,04 - 0,4	0,21 - 2,72		4,56 - 23,6				0,02 - 20,2		0,01 - 2,22		Kiss et Sass-Kiss (2005)

Ethanolamine (ETA), histamine (HIM), putrescine (PUT), cadavérine (CAD), tyramine (TYM), tryptamine (TRP), phényléthylamine (PHM), éthylamine (ETM), méthylamine (MEM), isoamylamine (ISM), agmatine (AGM), spermidine (SPD), spermine (SPM), sérotonine (SER)

nd = non détecté ; tr = traces ; (n) = nombre de vins analysés

Tableau VII - Concentration des amines biogènes dans le vin rosé en $mg.L^{-1}$.

Pays	ETA	HIM	PUT	CAD	TYM	TRP	PHM	ETM	MEM	ISM	AGM	SER	SPD	SPM	Références
Espagne (7)	-	nd - 3,24	3,25 - 9,6	nd - 2,87	0,33 - 2,59	nd	nd	-	-	-	-	-	nd	nd	Romero *et al.* (2002)
Espagne (8)	nd - 2,01	0,46 - 5,18	2,64 - 4,01	nd - 0,34	nd	-	-	nd - 2,15	0,25 - 0,92	0,39 - 0,68	-	-	-	-	Busto *et al.* (1996)
France (15)	-	0,4	2,5	0,4	2,3	-	1,5	-	-	-	9	-	0,4	0,2	Bauza *et al.* (1995a)
Grèce (8)	-	nd - 4,43	nd - 1,85	nd - 4,49	nd - 1,64	-	nd - 1,68	nd - 1,32	nd - 0,5	nd - 1,44	-	-	nd - 0,29	nd - 0,91	Soufleros *et al.* (2007)
USA (1)	-	nd	0,36	nd	-	-	-	-	-	-	1,2	nd	nd	nd	De Borba *et al.* (2007)

Ethanolamine (ETA), histamine (HIM), putrescine (PUT), cadavérine (CAD), tyramine (TYM), tryptamine (TRP), phényléthylamine (PHM), éthylamine (ETM), méthylamine (MEM), isoamylamine (ISM), agmatine (AGM), spermidine (SPD), spermine (SPM), sérotonine (SER)

nd = non détecté ; tr = traces ; (n) = nombre de vins analysés

La synthèse des tableaux V, VI et VII montre que la majorité des études concernant la quantification des AB sont effectuées sur le vin rouge. La comparaison de l'abondance des AB dans les trois types de vin montre que le vin rouge est le plus riche en ces composés. Cette richesse est due à (i) la fermentation malolactique menée pendant le processus de fabrication de ce type de vin, (ii) à l'acidité relativement faible de ce dernier, cette faible acidité favorisant croissance et diversité bactérienne (Lonvaud-Funel, 2001) et donc possibilité d'une production importante des AB.

Pour le même type de vin, on peut constater une variation importante de la concentration des AB donnée par les différentes études. Elle est due à la composition différente de la matière première et notamment pour les acides aminés, aux différents processus de vinification utilisés et aussi aux méthodes analytiques utilisées.

La putrescine et l'histamine sont systématiquement dosées dans tous les types de vin, la cadavérine et la tyramine presque toujours. Les autres amines ne sont pas toujours quantifiées par les auteurs, mais la plupart d'entre elles, lorsqu'elles sont dosées, ont des concentrations le plus souvent faibles.

Les AB les plus abondantes dans les trois types du vin sont respectivement : putrescine, histamine, tyramine, cadavérine et phényléthylamine. Les concentrations les plus élevées répertoriées dans ces différentes études peuvent être problématiques d'un point de vue sanitaire. Ainsi on peut trouver jusqu'à 99,9 $mg.L^{-1}$ pour la putrescine (Bover-Cid *et al.*, 2006), 25,2 $mg.L^{-1}$ pour l'histamine (Simo *et al.*, 2008), 30,4 $mg.L^{-1}$ pour la cadavérine (Garcia-Villar *et al.*, 2007), 59,7 $mg.L^{-1}$ pour la tyramine (Hlabangana *et al.*, 2006) et 8,15 $mg.L^{-1}$ pour la phényléthylamine (Souffleros *et al.*, 2007). Mais heureusement dans la très grande majorité des vins les concentrations mesurées sont très faibles.
L'agmatine, la sérotonine et l'éthanolamine sont rarement quantifiées. Or l'éthanolamine peut atteindre plusieurs dizaines de $mg.L^{-1}$ tout comme l'agmatine ; les teneurs les plus élevées dosées sont pour l'éthanolamine 27,8 $mg.L^{-1}$ en vin rouge (Herbert *et al.*, 2001) et pour l'agmatine avec une moyenne de 21,6 $mg.L^{-1}$ pour 54 vins rouges (Bauza *et al.*, 1995a).

Différents paramètres influencent les concentrations en amines du vin :

a) les levures

Du moût au vin, il y a une augmentation des amines (Bauza *et al.,* 2007). Comme les teneurs des AB sont très faibles dans les baies mûres, les AB sont synthétisés par les microorganismes du vin. Dans les vins il ya deux process fermentaires : FA (par les levures) et FML (par les bactéries). Les AB peuvent être libérés par les microorganismes aux différentes étapes de la vinification. Au cours de la fermentation alcoolique effectuée par les levures notamment par *Saccharomyces cerevisiae,* les sucres sont convertis en gaz carbonique et en éthanol. Plusieurs études montrent que cette fermentation peut contribuer à l'augmentation de la teneur en AB dans le produit final (Caruso *et al.,* 2002 ; Torrea et Ancín, 2002). La concentration en AB d'un vin dépend ainsi de la levure utilisée pour la fermentation alcoolique (Manfroi *et al.,* 2009). Pour Granchi *et al.* (2005), *S. cerevisiae* et *M. pulcherrima* en prosuisent environt 13 $mg.L^{-1}$ alors que les levures *K. apiculata, Candida* en produisent moins de 10 $mg.L^{-1}$. La levure d'alteration *Brettanomyces bruxellensis* serait capable d'en synthétiser jusqu'à 20 $mg.L^{-1}$.

Pour Schneider (2011), les levures augmentent ou réduisent les teneurs en putrescine et histamine du vin ; cela dépend de la souche de levure utilisée mais également de la concentration en acide aminé précurseur. Les fermentations faites par les non-*Sacharomyces* ont toujours abouti à des vins moins riches en amines. Les levures forment vraisemblablement de très faibles teneurs en histamine en condition normales : < à 2 $mg.L^{-1}$ (Aerny, 1985).

b) Les bactéries lactiques

La fermentation malolactique (FML) est un processus fermentaire lors de l'élaboration des vins et notamment des vins rouges qui intervient après la FA. La FML joue un rôle important sur la qualité finale des vins. Cette fermentation est réalisée par des bactéries lactiques et plus communément par *Oenococcus oeni*, qui est une bactérie particulièrement bien adaptée aux conditions difficiles du vin. Ces bactéries sont capables de produire une large gamme d' AB dans le vin tels que la putrescine, l'histamine, la tyramine, la cadavérine, la spermidine, l'agmatine, la tryptamine, la phénylétylamine, l'isoamylamine, l'éhylamine et la méthylamine (Lonvaud-Funel, 2001; Guerrini *et al.,* 2002; Hernández-Orte *et al.,* 2006; Izquierdo Canãs *et al.*, 2008; Marques *et al.,* 2008; Rosi *et al.,* 2009, Pramateftaki *et al.,* 2012). Manfroi *et al.* (2009) ont montré que le profil en AB dépend du type de microorganismes utilisés pendant la FML. La production des AB

par différentes souches de *O. oeni* a été aussi étudiée par Rosi *et al.* (2009). Après 30 jours de FML, des différences dans les teneurs en histamine, tyramine, putrescine et cadavérine ont été observées. La capacité de *O. oeni* à produire les amines biogènes dépend de la souche bactérienne mais aussi de la composition du vin. Polo *et al.* (2010) ont montré également que la production des AB est plus importante en flore indigène qu'avec des starters malolactiques. Pour Romero *et al.* (2002), la formation des amines se fait essentiellement par les bactéries lactiques pendant la FML et cette production est plus importante dans le vin rouge qu'en vin blanc. Del Prete *et al.* (2009) expliquent l'augmentation des teneurs en agmatine et en tyramine observée après FML non pas par une synthèse de ces composés par les bactéries mais probablement par une hydrolyse enzymatique bactérienne des complexes agmatine- ou tyramine-acides hydroxycinnamiques présents dans le raisin qui libéreraient ainsi de l'agmatine et de la tyramine.

Lorsque les FML sont difficiles ou lorsque les vins ont des acidités volatiles élevées, il y aurait plus de tyramine de produite pour Vidal-Carou *et al.* (1990). Un grand nombre d'auteurs signalent que la formation d'AB dans les vins est liée bien sûr à la FML mais qu'elle devient importante surtout après la FML (Granchi *et al.,* 2005 ; Landete *et al.,* 2005b ; Hernandez-Orte *et al.,* 2008 ; Herbert *et al.,* 2005 ; Rosi *et al.,* 2009) ou lors d'altération du vin (Souffleros *et al.,* 2007). Ainsi, des valeurs très élevées d'histamine (33 $mg.L^{-1}$), de putrescine (135 $mg.L^{-1}$), de tyramine (10,8 $mg.L^{-1}$) et de cadavérine (1,5 $mg.L^{-1}$) ont été quantifiées dans un vin rouge qui possédait une odeur désagréable pouvant indiquer une altération microbienne (Pena-Gallego *et al.,* 2009).

5. Formation des amines biogènes

La formation des AB dans les produits dépend (i) de la disponibilité des précurseurs (ii) de la présence de microorganismes décarboxylase-positifs (iii) et des conditions environnementales qui permettent la croissance bactérienne et l'activité décarboxylase.

5.1. Disponibilité des précurseurs

Les acides aminés libres se présentent naturellement dans les produits alimentaires ou peuvent être formés par l'activité protéolytique. L'activité enzymatique protéolytique bactérienne augmente la formation d'amines en augmentant la disponibilité en acides aminés libres. Le taux de décarboxylation des acides aminés dépend de la concentration d'amine produite ou de la présence

d'autres amines. Par exemple, il a été montré que la formation de l'histidine décarboxylase est inhibée par l'accumulation de l'histamine dans le milieu (Omura *et al.*, 1978).

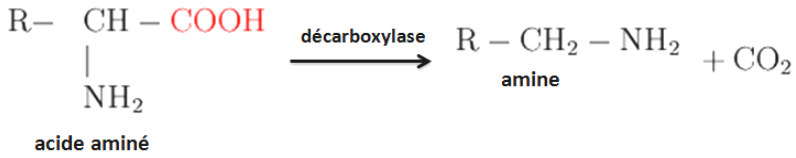
Dans le vin, l'influence de la concentration en acides aminés précurseurs sur la teneur en amines biogènes n'est pas simple à établir. Pour Bauza *et al.* (1995b), aucune corrélation entre les niveaux de phényléthylamine, tyramine et histamine dosés dans les vins et les concentrations en phénylalanine, tyrosine et histidine ne peut être établie. Par contre, Herbert *et al.* (2005) relient très nettement la richesse en amines biogènes du vin à celle des acides aminés déterminée en moût de raisin. Ainsi, dans leur étude portant sur les moûts et vins de la région viticole portuguaise Alentejo, les variétés qui possèdent les teneurs les plus élevées en amines sont effectivement celles qui ont les valeurs les plus fortes en acides aminés que ce soit en vin rouge ou en blanc. Hernandez-Orte *et al.* (2008) expliquent eux aussi les teneurs en amines plus élevées dans les vins rouges issus de Tempranillo que dans ceux issus de Cabernet Sauvignon par la richesse plus grande en acides aminés du cépage Tempranillo. Pour Moreno-Arribas et Polo (2008), les teneurs les plus élevées en putrescine et cadavérine pour des vins élevés sous voile de levures sont trouvées sur les vins qui initiallement contenaient les concentrations les plus fortes en arginine, ornithine et lysine. La tyramine produite par *L. brevis* et *E. faecium* est en lien direct avec la quantité du précurseur du milieu pour Marcobal *et al*. (2006). Récemment, Arena *et al*. (2011) voient une très forte influence de la teneur en substrats (tyrosine et arginine) dans le milieu sur l'expression des gènes *tdc* et *aguA2* codant pour la tyrosine décarboxylase et l'agmatine déiminase chez une souche de *L. brevis*, lorsque les teneurs en arginine et en tyrosine du milieu augmentent, qui se traduit effectivement par une augmentation significative des concentrations en amines : 6 fois plus de tyramine et 12 fois plus de putrescine.

De plus, plusieurs études s'accordent sur le point suivant : lorsque les vins sont élevés sur lies après la fermentation alcoolique, on note très souvent des augmentations significatives des amines histamine et putrescine au cours de l'élevage (Martin-Alvarez *et al*., 2006 ; Alcaide-Hidalgo *et al*., 2007 ; Marques *et al*., 2008 ; Perez-Serradilla et Luque de Castro, 2008)). Ceci est du vraisemblablement à la libération progressive du contenu intracellulaire des levures par autolyse qui entraine alors une augmentation notable des teneurs en acides aminés libres et donc des précurseurs potentiels d'amines (Charpentier et Feuillat, 1993 ; Alexandre *et al.*, 2001). L'impact des lies sur les teneurs en AB des vins n'est pas si simple cependant. En effet, certains travaux montrent l'effet bio-sorbant des parois de levures sur des composés volatils notamment (Chassagne *et al*., 2005 ; Pradelles *et al*., 2008) et aussi sur les AB (Herr *et al*., 2012). Cependant, pour ces derniers, l'efficacité d'adsorption n'est pas très grande car ils observent un relargage

rapide d'AB dans le vin suite à l'agitation du milieu. Par ailleurs ces auteurs pensent que les teneurs élevées en AB dans les lies pourraient s'expliquer outre l'adsorption par une plus grande biomasse bactérienne au niveau des levures mortes et donc à une plus grande activité décarboxylase bactérienne.

5.2. Présence des microorganismes décarboxylase-positifs

Les décarboxylases sont des enzymes qui catalysent les réactions de décarboxylation des acides aminés :



Les acides aminés précurseurs sont transportés par ce qu'on appelle les transporteurs membranaires, ces derniers amènent les acides aminés dans la cellule et exportent les produits de la décarboxylation vers le milieu extracellulaire (Fig. 1). La présence d'un système antiport histidine/histamine a été rapporté chez *Lactobacillus buchneri* ST2A (Molenaar *et al.*, 1993). D'autres transporteurs acides aminés/amines biogènes ont été également caractérisés chez d'autres microorganismes, par exemple le système tyrosine/tyramine chez *Lactobacillus brevis* (Wolken *et al.*, 2006) ou les transporteurs de la putrescine et de la cadavérine chez *Escherichia coli* (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004).

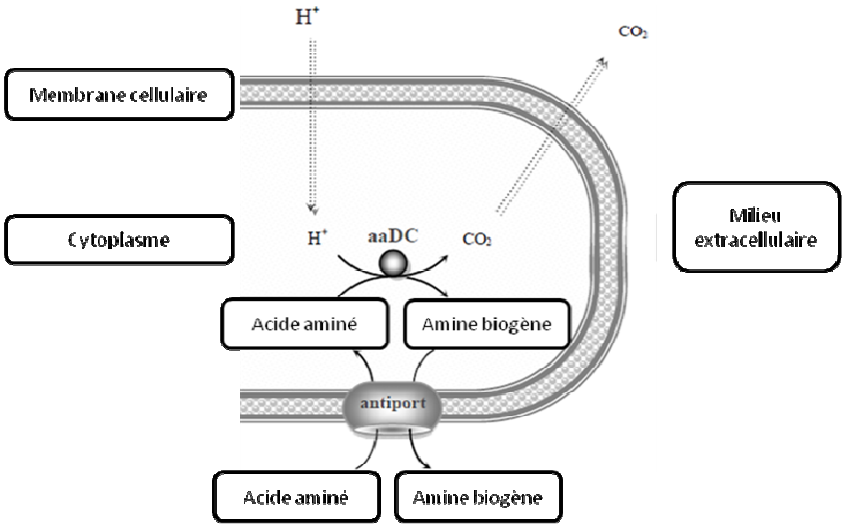


Fig. 1 - Voies métaboliques de la biosynthèse des amines dans les bactéries.

Une fois que les acides aminés sont transportés dans le milieu intracellulaire, un cofacteur nommé pyridoxal-5`-phosphate (PLP) est essentiel pour assister la réaction de décarboxylation (Bover-Cid et Holzapfel, 1999). Les principales amines biogènes, leurs acides aminés précurseurs ainsi que leurs enzymes décarboxylases sont données dans le tableau VIII.

Tableau VIII - Amines biogènes et acides aminés précurseurs (selon Ten Brink *et al.*, 1990).

Acides aminés	Décarboxylases	Amines biogènes
Histidine	Histidine décarboxylase	Histamine
Tryptophane	Tryptophane décarboxylase	Tryptamine / Sérotonine
Tyrosine	Tyrosine décarboxylase	Tyramine
Phénylalanine	Phénylalanine décarboxylase	Phényléthylamine
Ornithine	Ornithine décarboxylase	Putrescine [1]
Lysine	Lysine décarboxylase	Cadavérine
Arginine	Arginine décarboxylase	Agmatine [2]

[1] La putrescine est le précurseur de la spermidine et de la spermine [2] L'agmatine peut être aussi le précurseur de la putrescine

Une grande variation a été rapportée concernant le type et la quantité d'amines biogènes produites entre les différentes souches d'une même espèce et certaines souches sont capables de produire plusieurs amines (Bover-Cid et Holzapfel, 1999).

Le rôle physiologique des amines est encore incertain mais l'accumulation de ces composés est considérée comme un mécanisme de défense vis-à-vis du milieu acide : moyen d'obtenir pour la cellule de l'énergie métabolique à travers les antiport acide aminé/amine électrogéniques permettant la génération d'une force proton motrice (Molenaar *et al*., 1993). Mais cette accumulation est aussi une réponse à un stress osmotique (Schiller *et al*., 2000) et à un stress oxydatif (Tkachenko *et al*., 2001).

5.2.1. vis-à-vis de l'histidine

La capacité de production de l'histamine a été trouvée chez les bactéries $Gram^-$ et $Gram^+$. Une étude réalisée par Bjornsdottir *et al*. (2009) sur la production de l'histamine par les espèces bactériennes ($Gram^-$) montre que 10 espèces (*Morganella morganii, Providencia rustigianii, Proteus mirabilis, Raoutella planticola, Raoultella ornithinolytica, Enterobacter aerogenes, Enterobacter gergoviae, Photobacterium damselae, Hafnia alvei et Citrobacter freundii*) sur 25 testées sont capables de produire l'histamine. Dans le vin, S*accharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus, Pediococcus* et l'espèce *Oenococcus oeni* sont capables de produire l'histamine (Torrea et Ancín, 2002 : Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994 ; Guerrini *et al.*, 2002 ; Landete *et al.*, 2005b ; Lucas *et al.*, 2005; Rosi *et al.*, 2009). Mais aujourd'hui se pose encore la question des microorganismes du vin responsable de cette synthèse et pour Garcia-Moruno et Munoz (2012), *O. oeni* ne serait pas l'agent principalement responsable.

La synthèse de l'histamine est liée à l'activité catalytique de l'histidine décarboxylase (HDC). L'HDC de *O. oeni* a été récemment caractérisée : cette enzyme se compose de 2 sous-unités (11 et 28 kDa environ). Son pH optimum est de 4,8 (Coton *et al*., 1998b) et le pyridoxal-5-phosphate est un cofacteur (Landete *et al*., 2006). L'histidine décarboxylase est inhibée par des teneurs usuelles dans les vins de SO_2 et d'éthanol (Farias *et al.*, 1993) mais elle reste toutefois mesurable après plusieurs mois de conservation du vin (36% de l'activité initiale) et ce en l'absence d'une population cultivable. D'un point de vue œnologique, ceci est important car il souligne le risque potentiel de formation d'histamine alors qu'aucune bactérie viable n'est détectée.

Les gènes *hdcP, hdcA* et *hisRS* codent repectivement un transporteur His/HIM, une histidine décarboxylase et une histidyl-t-RNA synthétase. Un gène *hdcB* code une protéine de fonction inconnue. Le caractère *hdc*+ n'est pas stable ; *L. hilgardii* producteur d'histamine perd ainsi la possibilité de synthéthiser l'histamine en fonction des conditions de culture (Lucas *et al.*, 2007).

Le cluster est localisé sur un plasmide instable d'environ 80 kb. Ce cluster a été détecté chez tous les microorganismes producteurs d'histamine (*L. hilgardii, O. oeni, T. muriaticus*). Lucas *et al.* (2008) suggèrent que, de fait, la forte identité retrouvée entre les séquences de *L. sakei, L. hilgardii, L. buchneri* pourrait avoir été acquise par transfert horizontal (Fig. 2).

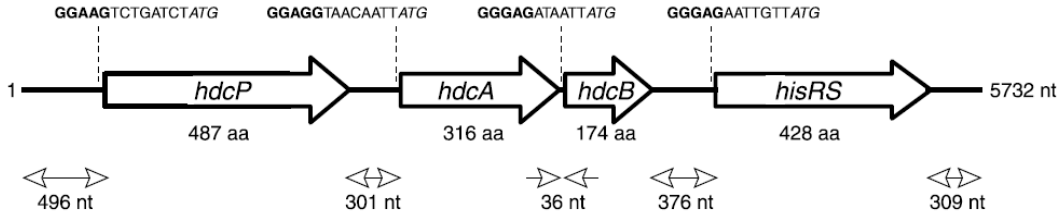


Fig. 2 - Organisation génétique du locus *hdcA* de *L. hilgardii* 0006.

Les phases d'ouverte de lecture ou ORF (Open Reading Frame) sont représentées par des flèches. Les séquences des sites de fixation des ribosomes (en gras) sont présentées en amont des codons de démarrage de la traduction (en italique). aa : acide aminé, nt : nucléotides (Lucas *et al.*, 2005).

Pour Coton *et al.* (1998a), le gène *hdc* est largement disséminé car plus de 50% des vins analysés contiennent des souches de *O. oeni hdc*+. Mais pour Garcia-Moruno et Munoz (2012), la présence dans la bactérie du gène *hdc* ne veut pas dire qu'il sera exprimé dans les conditions stressantes du vin.

La production d'histamine serait favorisée en conditions nutritionnelles pauvres pour Lonvaud-Funel et Joyeux (1994) alors que pour Farias *et al.* (1993) la présence de sucres dans le milieu est nécessaire au transport de l'histidine. La présence d'histidine induit l'expression du gène *hdc* tandis que l'histamine cause une diminution de son expresion sans effet direct sur l'activité enzymatique de l'HDC (Landete *et al.*, 2006). Le maximum d'activité de l'HDC est mesuré durant la phase exponentielle de croissance, avec une forte diminution en fin de la phase stationnaire pour Landete *et al.* (2006) alors que Pessione *et al.* (2005) observent une forte synthèse de l'HDC en phase stationnaire de croissance en présence d'une forte concentration d'histidine.

5.2.2. vis-à-vis de la tyrsosine et de la phénylalanine

Les bactéries $Gram^+$ et surtout les bactéries lactiques sont productrices de tyramine : *Streptococcus* sp et *L. curvatus* en charcuterie,,*L. brevis* dans les fromages, *Enterococcus sp., L. brevis* et *L. curvatus* dans les produits laitiers (Straub *et al.,* 1994 ; Joosten et Northolt 1989 ; Ladero *et al*., 2010 ; Marcobal *et al.,* 2012). Un minimum de 10^4 microorganismes producteurs par g de produit et une certaine richesse en tyrosine du milieu sont cependant nécessaires pour avoir une teneur significative de tyramine dans le produit. Dans la bière, ce sont les *Pediococcus* qui sont surtout responsables de la présence de cette amine mais ici aucun lien entre richesse en substrat et amine produite n'est trouvé (Izquierdo-Pulido *et al*., 2000).

Dans le vin, beaucoup d'espèces de bacilles dont notamment *L. brevis* mais aussi *Pediococcus parvulus*, *Enterococcus faecium* et *Oenococcus oeni* ont été décrits comme producteurs de tyramine (Moreno-Arribas *et al.,* 2000 ; Nannelli *et al.,* 2008 ; Coton *et al.,* 2010a ; Rosi *et al.,* 2009). La synthèse apparait le plus souvent après la FML (Rosi *et al.,* 2009) et est très dépendante de la concentration en tyrosine sans qu'il y ait de lien entre niveau de la population et quantité de tyramine produite (Marcobal *et al.,* 2006). La croissance bactérienne est bien sûr indispensable mais ce n'est pas la condition essentielle pour la production. Pour *Enterococcus faecium* isolée de raisin, la production maximale est observée dans les milieux de cultures les plus acides car la tyramine pourrait contribuer à une neutralisation de l'acidité du milieu et donc permettre la croissance bactérienne. Gardini *et al. (*2005) notent cependant chez *O. oeni* une diminution de synthèse de tyramine en présence élevée d'éthanol ou à faible pH sans doute par réduction globale de l'activité métabolique de la bactérie plus que par inhibition de la TDC. Lorsque la concentration en sucres augmente dans le milieu, la production diminue fortement. Ce n'est cependant qu'en présence de petites quantités de sucres, que l'activité TDC est possible ; ceci signifie que le transport tyrosine/tyramine apporte sans doute un peu d'énergie à la cellule mais pas suffisamment pour permettre une croissance. Le transport des acides aminés vers le milieu intracellulaire ne se fait pas seulement par voie active, mais est possible aussi par diffusion passive à cause de l'hydrophobicité de la chaine latérale de la tyrosine (Konings *et al.,* 1989).

La tyrosine décarboxylase (TDC) a été caractérisée chez *L. brevis.* Elle a un pH optimum de 5 et est pyridoxal-5'-phosphate dépendante (Moreno-Arribas et Lonvaud-Funel, 1999). L'activité augmente pendant la croissance bactérienne et atteint un maximum à la fin de la phase exponentielle de croissance (Moreno-Arribas *et al*., 2000). La tyramine produite réduit cependant

l'activité TDC sans doute par inhibition du transport tyrosine/tyramine. Arena *et al.* (2011) montrent une forte influence du substrat sur l'expression du gène codant pour la tyrosine décarboxylase chez *Lactobacillus brevis*.

Après purification de l'enzyme TDC de *L.brevis*, une séquence partielle du gène *tdc* a été déterminée dans le but de créer des sondes pour détecter les microorganismes producteurs de tyramine (Lucas et Lonvaud-Funel, 2002). Chez *Carnobacterium divergens,* la région codant pour l'enzyme contient 1875 pb (Coton *et al.,* 2004). Chez *L. brevis* et *Enterococcus* spp., le cluster code une perméase, une tyrosyl-t-RNA synthétase, un antiport Na+/H+ et la TDC (Lucas *et al.,* 2003). Il semble exister une forte similarité dans la séquence et l'organisation du cluster chez les différentes microorganismes producteurs (Fernandez *et al.,* 2004).

Les microorganismes producteurs de phényléthylamine sont des souches de *Enterococcus faecalis,* de *Lactobacillus sakei* mais aussi de *L. curvatus, L. brevis, L. hilgardii, Saccharomyces cerevisiae et Oenococcus oeni* (Granchi *et al.,* 2005; Landete *et al.,* 2007; Moreno-Arribas et Carmen Polo, 2008; Vigentini *et al.,* 2009). Les souches de *L. brevis* fortement productrices de tyramine le sont aussi de phényléthylamine mais avec des teneurs produites pour cette dernière beaucoup plus faibles (Moreno-Arribas *et al.,* 2000 ; Landete *et al.,* 2007). En fait, la décarboxylation de la phénylalanine se fait après totale disparition de la tyrosine du milieu par l'activité de la TDC. Cette enzyme est non spécifique et a une plus faible affinité pour la phénylalanine (Pessione *et al.,* 2009 ; Marcobal *et al.,* 2012). Les amorces utilisées pour la détection du gène *tdc* sont actuellement utilisés pour la détection des microorganismes producteurs de phényléthylamine.

5.2.3. vis-à-vis de l'arginine

Les bactéries homofermentaires, pédiocoques ou lactobacilles, isolés de l'environnement vin ne catabolisent pas l'arginine alors que les bactéries hétérofermentaires, lactobacilles, *Leuconostoc* ou *Oenococcus*, le peuvent (Liu et Pilone, 1998).

La production de putrescine a ainsi été détectée chez *Oenococcus oeni* (Guerrini *et al.*, 2002 ; Marques *et al.*, 2007 ; Rosi *et al.*, 2009), chez *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri* (Arena et Manca de Nadra, 2001; Lucas *et al.*, 2007; Nannelli *et al.*, 2008; Ladero *et al.*, 2010). Certaines espèces de levures du vin tels que *Kloeckera apiculata, Metschnikowia pulcherrima, Brettanomyces bruxellensis* et *Saccharomyces cerevisiae* le peuvent aussi (Caruso *et al.*, 2002).

La production d'agmatine dans le vin est faite par différentes espèces de levures, *Saccharomyces cerevisiae, Hanseniaspora uvarum, Candida stellata, Metschnikowia pulcherrima et Brettanomyces bruxellensis,* (Romano *et al.*, 2007) mais aussi par des *Lactobacillus* (Arena et Manca de Nadra, 2001).

La voie de catabolisme de l'arginine est schématisée dans la figure 3.

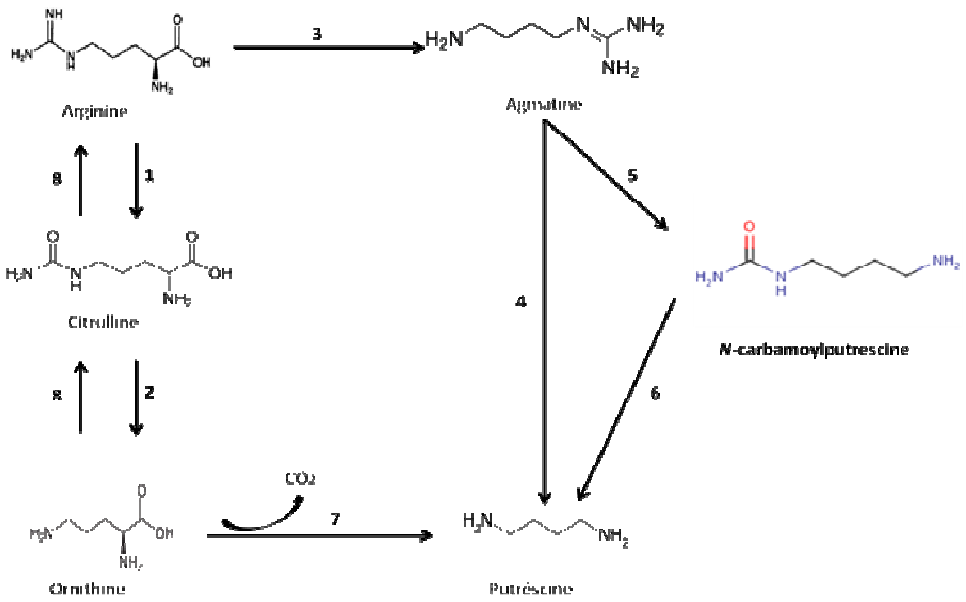


Fig. 3- Voies métabolique de l'arginine chez les bactéries (Arena et Manca de Nadra, 2001)

(1) arginine déiminase ; (2) ornithine transcarbamylase ; (3) arginine décarboxylase ; (4) agmatine déiminase ; (5) Agmatinase ; (6) N-Carbamoylputrescine hydrolase ; (7) ornithine décarboxylase ; (8) système anabolique

La voie de l'arginine déiminase dite ADI existe chez les bactéries lactiques utilisant l'arginine (Liu *et al* ; 1995) et comprend 3 enzymes qui ne sont pas forcément toujours présentes toutes les 3 dans la souche bactérienne (Liu et Pilone, 1998). Il s'agit de l'arginine déiminase (ADI), de l'ornithine transcarbamoylase (OTC) et de la carbamate kinase (CK). Les réactions sont décrites ci-dessous :

1. Arginine déiminase (ADI)

   L-Arginine + H_2O → Citrulline + NH_3

2. Ornithine transcarbmoylase: (OTC)

   L-citrulline + HPO_4^{2-} → carbamoyl phosphate + L-ornithine

3. Carbamate kinase (CK)

   carbamoyl phosphate + ADP + H_2O → CO_2 + NH_3 +ATP

Bilan : L-Arginine + ADP + $2H_2O$ + HPO_4^{2-} => L-ornithine + CO_2 + $2NH_3$ + ATP ΔG = -29 kJ/mol

Cette voie ADI conduit à une faible libération de citrulline dans le milieu extracellulaire qui peut être réutilisée ou non par la bactérie. Cette excrétion serait due à une formation de citrulline par l'ADI plus rapide que la phosphorylation par l'OTC qui conduit alors à la formation d'ornithine et de carbamyl-phosphate et qui apparait être thermodynamiquement défavorable (Mira de Orduna *et al.,* 2001).

L'arginine joue un rôle important dans l'adaptation des bactéries aux différents stress du vin. En effet, son métabolisme permet d'augmenter le pH intracellulaire par la production de NH_3 et génère de l'énergie métabolique sous forme d'ATP (Liu et Pilone, 1998, Tonon *et al.,* 2001). Ceci favorise la croissance mais surtout le temps de survie en milieu vin (Tonon et Lonvaud-Funel, 2002).

Cette voie ADI est à l'origine de l'apparition dans le milieu de précurseurs du carbamate d'éthyle connu pour son action cancérigène à savoir la citrulline et le carbamyl-phosphate (Ough *et al.,* 1988) et pourrait ainsi contribuer à la formation du carbamate d'éthyle dans le vin (Liu *et al.,* 1994) ; ce dernier étant cependant surtout formé chimiquement par réaction spontanée entre l'urée synthétisée par les levures et l'éthanol au cours du vieillissement du vin. Le fait que *O. oeni* soit capable de réutiliser la citrulline excrétée contribuerait à diminuer la formation de carbamate d'éthyle dans le vin (Arena *et al.,* 1999 ; Arena et Manca de Nadra, 2005).

O. oeni possède le locus ADI (arginine déiminase) qui comprend les gènes impliqués dans le catabolisme de l'arginine en ornithine (Divol *et al.*, 2003 ; Tonon *et al.*, 2001) (Fig. 4). Le cluster contient les gènes suivants : *arcA* codant l'arginine déiminase (ADI), *arcB* l'ornithine transcarbamoylase (OTC), *arcC* la carbamate kinase (CK), *arcD* les protéines responsables de l'antiport Arg/Orn. Dans les conditions de culture testées, l'expression des gènes est constitutive (Divol *et al.*, 2003). Cependant, le gène *arcR* pourrait coder un régulateur transcriptionnel de cet opéron (Nehme *et al.*, 2006).

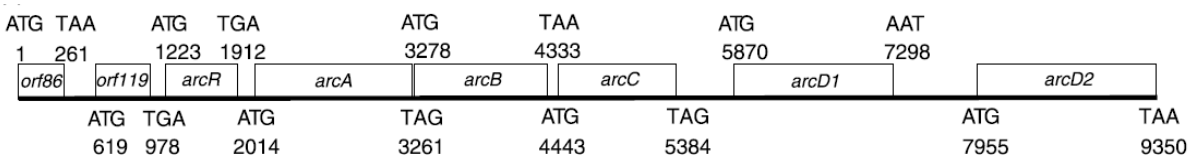


Fig. 4 - Organisation du cluster *arc* (Divol *et al.*, 2003)

L'arginine peut aussi être décarboxylée directement en agmatine par l'arginine décarboxylase (ADC) ; ceci a été montré chez les *Lactobacillus* (Arena *et al.*, 2002) dont *L. hilgardii* (Alberto *et al.*, 2007).

La putrescine dosée dans les vins peut donc être produite par deux voies métaboliques : la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC) et la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) (Arena et Manca de Nadra, 2001 ; Lonvaud-Funel, 2001). La première voie correspond à une décarboxylation de l'ornithine et la deuxième voie à une déimination de l'agmatine. Dans le vin cependant, seule une faible population bactérienne ($<10^2$ cellules/mL) possède la voie agmatine déiminase alors que 10^5 à 10^6 cellules/mL portent le gène codant l'ornithine décarboxylase.

La putrescine apparaît souvent après la FML et il a été montré qu'elle peut être produite à travers une association métabolique entre différentes souches, certaines capables seulement de dégrader l'arginine en ornithine et d'autres capables de seulement décarboxyler l'ornithine en putrescine (Mangani *et al.*, 2005).

L'ODC de *O. oeni* a été caractérisée par Bonnin-Jusserand *et al.* (2011). Elle a poids moléculaire de 85 kDa. L'activité maximale se retrouve à pH 5,5 pour une température de 35°C et elle apparaît spécifique de l'ornithine.

5.3. Conditions environnementales permettant la croissance bactérienne et l'activité enzymatique

5.3.1. Généralités

Les facteurs environnementaux affectant la formation des amines sont similaires à ceux qui affectent la croissance et l'activité enzymatique du microorganisme. Ces facteurs sont en général i) la température ; ii) le pH ; iii) l'activité de l'eau (a_w) et iv) les conditions de conservation.

La température a en effet un impact important sur la formation des AB dans les aliments. Plusieurs études montrent que la teneur des AB dans les aliments et dans les boissons augmente avec le temps et la température de stockage (Klausen et Lund, 1986 ; Diaz-Cinco *et al.*, 1992; Standarová *et al.*, 2010 ; Kil *et al.*, 2011). Une température élevée favorise la formation des AB, cette élévation a deux effet principaux : (i) un effet sur la protéolyse due à l'augmentation de la croissance microbienne (ii) et un effet direct sur l'activité décarboxylase (Maijala *et al.*, 1995).

Les amines biogènes seraient impliquées dans la résistance au stress acide et dans la production d'énergie métabolique (Pereira *et al.*, 2009).
L'activité de l'eau (a_w) ou "eau libre" indique le "degré de liberté" de l'eau absorbée dans les matériaux. L'activité des microorganismes dans les aliments dépend directement de l'activité de l'eau. De fortes concentrations de solutés (par exemple, chlorure de sodium) peuvent diminuer l'activité de l'eau, ce qui inhibe la formation d'amines dans les aliments, car une faible a_w retarde la croissance bactérienne (Gardini *et al.*, 2001).

Les conditions de conservation et l'ajout de conservateurs ont également des effets significatifs sur la formation des AB dans les aliments. Halász *et al.* (1994) ont rapporté que dans les conditions d'anaérobiose, *Enterobacter cloacale* produit environ deux fois moins de putrescine que dans les conditions d'aérobiose, et *Klebsiella pneumonie* synthétise nettement moins de cadavérine. L'ajout d'agents conservateurs dans les aliments influe aussi la dynamique des populations microbiennes, et, par conséquent, la production d'AB. Shalaby (1996) a rapporté que le sorbate de potassium, fréquemment utilisé comme inhibiteur microbien, limite la formation d'amines biogènes dans les aliments.

5.3.2. Conditions œnologiques

a) Température

La température semble avoir un effet faible sur la formation des AB dans le vin, González Marco et Ancín Azpilicueta (2006) ont montré une légère augmentation dans le vin de la concentration en histamine à une température de 20°C par rapport aux autres températures testées (4 et 35°C). Ces auteurs suggérent que l'activité décarboxylase est plus importante à 20°C et surtout que l'enzyme HDC pourrait se maintenir même en l'absence de bactéries viables. C'est ce que trouvent aussi de Borba et Rohrer (2007) : sur un vin stoké à 4°C, il y avait une augmentation de de 12 à 87% de l'histamine, de 0 à 1,4 $mg.L^{-1}$ de la spermidine et de 20 à 36% de putrescine et ce en l'absence de bactéries vivantes, en raison sans doute de leur activités enzymatiques décarboxylases toujours présentes et encore efficaces.

b) Acidité du milieu

Guerrini *et al.* (2002) ont montré la production des AB telles que : la putrescine, la cadavérine et l'histamine par des souches de *O. oeni* au pH optimal de leur croissance. A faible pH, les souches de *O. oeni* maintiennent la production de ces AB avec apparition d'une nouvelle amine telle que la spermidine. Mais d'autres études montrent que la teneur en histamine, en tyramine et en spermidine augmente avec l'augmentation du pH du vin (Gardini *et al.,* 2005 ; Bauza *et al*., 1995b ; Proestos *et al.,* 2008). Marcobal *et al.* (2005) trouvent ainsi qu'un vin à pH 3,25 ne contient pas d'amines biogènes alors que le même vin à pH 4,09 en contient 43,8 $mg.L^{-1}$. La concentration en histamine dans un vin à pH 3,09 est de 0,8 $mg.L^{-1}$ alors qu'elle atteint 12,2 mg. L^{-1} pour un pH de 3,5 (Garcia-Villar *et al.,* 2006). Ceci est confirmé par Gerbaux et Monamy (2000) en ce qui concerne la putrescine, l'histamine et la tyramine. Pour Landete *et al.* (2005b), si le lien est clair entre faible pH et faible teneur en histamine, cela est cependant moins net pour la tyramine et la phényléthylamine. Il n'y aurait d'ailleurs pas d'utilisation de l'arginine par les lactobacilles et par *Oenococcus oeni* lorsque le pH devient inférieur à 3,5 (Terrade et Mira de Orduna, 2006 ; Mira de Orduna *et al*., 2001). Une diminution du pH du milieu n'affecterait pas l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de la tyrosine et de l'arginine chez *L. brevis* (Arena *et al*., 2011).

c) Teneur en éthanol

La teneur en alcool a également un effet significatif sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques du vin. La production de la putrescine et de la tyramine par *O. oeni* diminue avec l'augmentation du degré alcoolique du vin (Gardini *et al.,* 2005 ; Marques *et al.,* 2007), cependant la production de la spermidine augmente légèrement avec l'augmentation du degré alcoolique (Gardini *et al.,* 2005).

d) Opérations préfermentaires

L'utilisation des enzymes pectolytiques et le sulfitage du moût de raisin ont un effet significatif sur la teneur en AB dans le vin. Ces enzymes augmentent le rendement en jus, permettent une diminution de la turbidité du moût vin et une plus grande extraction des composés phénoliques et des arômes. Martín-Álvarez *et al.* (2006) rapportent ainsi que l'utilisation de ces enzymes peut, en contenant des activités enzymatiques secondaires telles que activités protéolytiques, contribuer par l'hydrolyse des protéines et des peptides à une libération accrue d'acides aminés dans le milieu. Seules les concentrations en phényléthylamine et cadavérine apparaissent pourtant affectées par l'utilisation de ces enzymes (Martín-Álvarez *et al.,* 2006).

La durée de macération est un facteur qui augmente l'extraction de certains composés de la pellicule du raisin tels que les composés phénoliques et les composés azotés (Ribéreau-Gayon *et al.,* 2006). Pour ces raisons la durée de macération peut affecter l'accumulation des AB dans le vin (Martín-Álvarez *et al.,* 2006). Leurs résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que l'augmentation de la durée de macération augmente la teneur en acides aminés (Guttart *et al.,* 1997), ce qui peut augmenter la teneur en AB dans le vin. Parmi les 5 cépages rouges cultivés en Ontario et testés, les vins de Pinot noir possèdent la teneur globale en amines la plus élevée avec les concentrations les plus fortes en histamine, putrescine, cadavérine et éthylamine (Soleas *et al.,* 1999). Ces auteurs font le lien avec les durées de macération plus longues pour le Pinot noir par rapport aux autres cépages en raison de la moins grande richesse en couleur de ses pellicules.

e) Stabilisation microbienne

Le sulfitage consiste à apporter au moût de raisin et au vin une quantité d'anhydride sulfureux (SO_2) pouvant éliminer les levures et les bactéries résiduelles et ainsi obtenir un produit microbiologiquement stable. Le sulfitage favorise également l'extraction des composés phénoliques et aromatiques par son effet sur la perméabilité des membranes des cellules de la pellicule du raisin. Marcobal *et al.* (2006) ont rapporté qu'il n'y a pas d'augmentation des amines

biogènes après l'addition de SO_2, ce qui indique que ce produit a un effet de prévention contre la production des AB par les bactéries lactiques du vin en tuant les bactéries. Cette observation est également faite par Gerbaux et Monamy (2000). Cependant pour López *et al.* (2009) et Bauza *et al.* (1995b), l'addition de SO_2 n'empêche pas toujours le développement des bactéries lactiques et/ou les activités enzymatiques responsables de la formation des AB. En réalité, plus longtemps les bactéries peuvent se maintenir vivantes dans le milieu et plus la teneur en amines biogènes produites est élevée (Polo *et al.*, 2010).

La formation de certaines amines dans le vin est liée aussi aux mauvaises conditions hygiéniques pendant le processus de vinification (Manfroi *et al.*, 2009). Delfini (1989) a ainsi montré qu'une concentration élevée en histamine dans le vin est liée à une contamination bactérienne essentiellement par *Pediococcus* spp., ces dernières pouvant être présentes dans le vin avec une faible concentration cellulaire. Un contrôle efficace de la fermentation malolactique est donc nécessaire pour prévenir la formation des AB dans le vin.

f) Starters malolactiques

Leur utilisation conduit toujours à des vins moins riches en amines (Marques *et al.*, 2008 ; Izquierdo Canas *et al.*, 2008 ; Gerbaux et Monamy, 2000 ; Lonvaud-Funel, 2001 ; Hernandez-Orte *et al.*, 2008 ; Nannelli *et al.*, 2008 ; Spano *et al.*, 2010). Les starters ont été en effet sélectionnés pour leur efficacité en vin mais aussi par l'absence de gènes codant des décarboxylases dans les bactéries utiliséees. De plus, en utilisant des starters, la FML est contrôlée par les vinificateurs et dès la fin de la FML les vins sont soutirés et sulfités ce qui contribue grandement à leur stabilisation microbienne. Il est nécessaire de s'assurer de leur efficacité sinon cela laisse le champ libre à la flore indigène et cela se traduit toujours par des augmentations de la teneur en AB (Bach *et al*., 2012). Des co-inoculations avec des levures sèches et des bactéries lyophilisées s'avèrent aussi très efficaces pour diminuer les concentrations en AB des vins rouges (Capozzi *et al*., 2012).

g) Conditions de conservation

Pour Garcia-Villar *et al.* (2006), il y a une corrélation entre la concentration en amines et la durée de l'élevage. Une mise en bouteilles aussitôt après FML aboutit toujours à des vins ayant une faible teneur en amines, alors qu'un élevage en fût augmente les teneurs en amines. L'augmentation de l'histamine et de la putrescine est très significative en vin rouge (Gerbaux et Monamy, 2000).

Le vieillissement du vin peut augmenter les concentrations en AB (Proestos *et al.*, 2008). Une étude sur l'évolution des amines dans les vins rouges au cours de leur vieillissement en fûts de chêne américain (*Quercus alba*) et de chêne français (*Quercus sessilis*) a été réalisée par Moreno *et al.* (2003). Les résultats de cette étude montrent que l'évolution des AB est similaire dans les deux types de bois. L'histamine et la tyramine ont été produites au début du processus de vieillissement et ne sont pas accumulées dans les vins en raison probablement de leurs dégradations. La production d'histamine dans les premiers mois de vieillissement est probablement due à l'activité décarboxylase et pourrait être favorisée par la libération des acides aminés par l'autolyse des levures. La putrescine est l'amine la plus abondante dans les vins; sa concentration augmente considérablement au cours du vieillissement, car elle ne subit pas de dégradation. La concentration de la cadavérine est légèrement augmentée au premier stade de vieillissement, cette amine également n'est pas dégradée au cours du vieillissement. D'autres études montrent que le vieillissement du vin ne change pas significativement la teneur en AB (Marcobal *et al.*, 2005). Récemment, Marchand et *al.* (2012) émettent l'hypothèse d'une synthèse chimique d'amines au cours du vieillissement du vin par décarboxylation chimique. En effet, au pH du vin les acides aminés précurseurs (His, Tyr, Phe, Orn, Leu, Lys) ont la fonction carboxyle sous forme carboxylate (COO^-) et la fonction amine sous forme NH_3^+. Ceci crée donc un centre électrophile qui peut permettre alors la décarboxylation. Ces auteurs trouvent en effet une relation inverse entre les valeurs de pKa et les taux d'amines dans des vins de millésimes différents. Les acides aminés ayant les valeurs les plus faibles de pKa correspondent aux plus fortes teneurs en amines dosées dans les plus vieux millésimes (cas notamment de l'histidine-histamine).

6. Dégradation des amines biogènes

Les amines biogènes dans les aliments peuvent être physiologiquement inactivées par les amines oxydases. Ces enzymes existent chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères. L'activité amine oxydase permet d'oxyder les amines, les produits de cette réaction sont : l'aldéhyde, le peroxyde d'hydrogène et l'ammoniac (Cooper, 1997). Des auteurs ont rapporté que certaines souches ont la capacité de dégrader les AB commes des souches appartenant aux genres *Micrococcus* et *Staphylococcus* (Leuschner *et al.*, 1998; Martuscelli *et al.*, 2000).

Les facteurs environnementaux peuvent aussi influencer la dégradation des amines dans les aliments, ils sont similaires à ceux qui affectent la formation d'amines. Leuschner *et al.* (1998) ont

observé que la dégradation de l'histamine et de la tyramine dépend du pH (avec un pH optimal égal à 7). La température joue aussi un rôle dans la dégradation des AB. La dégradation de l'histamine observée à 22°C et 15°C est cependant maximale à 37°C (Dapkevicius *et al.*, 2000) .

Dans les conditions œnologiques, Cueva *et al.* (2012) montrent la dégradation de l'histamine, de la tyramine et de la putrescine par les champignons de la vigne en milieu synthétique (yeast carbon base) additionné de leurs précurseurs. *Alternaria sp., Penicillium roqueforti, Penicillium citrinum, Phoma sp., Ulocladium chartarum* apparaissent ainsi capables de dégrader 100% des 3 amines considérées. En milieu vin, le pourcentage de dégradation varie en fonction du type de vin et de l'amine. Les activités amines oxydases sont responsables de la diminution de la teneur en amines. Par contre, certaines bactéries lactiques du vin appartenant aux genres *Pediococcus* et *Lactobacillus,* apparaissent capables de diminuer nettement les niveaux en histamine, putrescine et tyramine en milieu synthétique ; cette capacité devient cependant très faible en vin. Seule une souche de *L. casei* fait diminuer les concentrations en histamine de 16%, en tyramine de 15% et en putrescine de 8% (Garcia-Ruiz *et al.,* 2011). Ce potentiel qui est en réalité effet peu fréquent chez les souches étudiées. est fortement réduit par la présence d'éthanol, de SO_2 et des polyphénols. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer une application industrielle afin de réduire la teneur en amines du vin.

Alcaide-Hidalgo *et al.* (2007) observent cependant une diminution de la teneur en tyramine des vins au cours de l'élevage qu'ils attribuent aux activités oxydasiques bactériennes (Marques *et al.*, 2008). Polo *et al.* (2010) notent aussi au cours de l'élevage des vins une baisse de la concentration en cadavérine qu'ils attribuent soit à la présence d'amines oxydases soit à une adsorption possible sur les lies comme le montrent Jimenez-Moreno *et al*. (2003).

7. Impact des amines biogènes sur le goût du vin

Au-delà des risques sanitaires, certaines AB responsables de défauts aromatiques peuvent altérer la qualité du vin. Lors d'une dégustation à l'aveugle de vins contenant de la putrescine ou de la cadavérine, plus de 50% du jury composé de consommateurs ont perçu un défaut (Silvano, 2008). Egalement Palacios *et al*. (2004) montrent que la putrescine et la cadavérine ont un effet négatif sur le goût du vin, en masquant la typicité du cépage. De plus des dégustateurs entraînés peuvent détecter des concentrations élevées d'histamine dans des vins commerciaux (Rohn *et al.*, 2005). Pour Dumoulin et Barthas (2009), la putrescine et la cadavérine entrainent des déviations de type

« putréfaction » ou «viande pourrie » à des niveaux assez élevées et qui pourraient alors déprécier les arômes du vin en agissant par masquage olfactif. Une addition de 60 $mg.L^{-1}$ de putrescine dans un vin rouge de Pinot noir aurait peu d'impact sensoriel (Gerbaux et Monamy, 2000) alors que pour Arena et Manca de Nadra (2001) lorsque la concentration en putrescine dépasse 20 à 30 $mg.L^{-1}$ en vin rouge et 15 à 20 $mg.L^{-1}$ en vin blanc cela diminue la qualité sensorielle des produits.

Chapitre II

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Bactéries indigènes

Des isolements de bactéries lactiques indigènes ont été réalisées 15 jours après la fin de la fermentation malolactique de trois vins rouges logés dans plusieurs contenants et caractérisés par des pH élevés (pH > à 3,6). Les vins sont du millésime 2009 :

- un vin des Côtes du Rhône (Appellation Côtes-du-rhône Village)
- un vin de Bordeaux (Appellation Pessac-Léognan)
- un vin de Bourgogne (Appellation Hautes Côtes de Nuits)

En effet, nous souhaitons pouvoir isoler des bactéries appartenant aux divers genres rencontrés dans les vins : *Oenococcus, Lactobacillus* et *Pediococcus.* Ainsi 80 souches ont été isolées.

Après dilution des vins dans de l'eau physiologique stérile (NaCl à 9 ‰ m/v), des étalements sur boites de Pétri ont été effectués. Le milieu utilisé est le milieu LAC solide dont la composition est décrite dans le paragraphe 3.1. Les souches isolées sont alors repiquées dans le milieu LAC liquide et conservées à -80°C dans le milieu LAC additionné de glycérol (40 %).

1.2. Bactéries de laboratoire

Les souches de référence utilisées sont :

- *L. brevis* IOEB 9809 (Coton et Coton, 2005)
- *O. oeni* IOEB 0610 (Faculté d'œnologie, Bordeaux, France)
- *O. oeni* BR 1497 (Faculté d'œnologie, Bordeaux, France)
- *O. oeni* Div 7.12 (Collection Lallemand, Blagnac, France)
- *O. oeni* IRBL 0079 (Inter-Rhône, Orange, France)

2 - Identification des souches isolées

2.1. Morphologie et caractères biochimiques

Toutes les souches indigènes isolées ont subi une coloration de Gram qui confirme ou non leur appartenance aux bactéries lactiques (Gram +) et permet de voir s'il s'agit de coques ou de bacilles, isolés, en paires, en tétrades ou en chainettes.
Les caractères biochimiques concernent l'utilisation de 49 sucres à l'aide de la galerie API 50 CH (bioMérieux, France).
Le milieu d'inoculation des cupules a une composition et un pH qui conviennent à la majorité des bactéries lactiques. Par contre, la très faible croissance de *Oenococcus oeni* sur ce milieu avec un virage de l'indicateur de pH indétectable demande l'utilisation d'un milieu de remplacement qui est le milieu FT80 sans acide malique et sans sucre à pH 5 additionné de 0,2 $g.L^{-1}$ de vert de Bromocrésol (Cavin *et al.*, 1989). Si la souche utilise le sucre testé, il ya alors acidification du milieu avec virage du vert au jaune de l'indicateur coloré.
Les galeries sont incubées 4 à 5 jours à 28°C en semi-anaérobiose (cupules remplies d'huile de paraffine).

2.2. Méthodes moléculaires

2.2.1. Extraction d'ADN

La technique utilisée est celle de Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega. L'extraction de l'ADN des bactéries est réalisée à partir des cultures en milieu liquide LAC. Les cellules sont récoltées à $A_{600\ nm} = 1$; 1mL est alors centrifugé 5 min à 10 000 g. Le culot obtenu est suspendu dans une solution de EDTA 50 mM pH 8, contenant du lysozyme (10 $mg.mL^{-1}$). Après incubation 60 min à 37°C puis centrifugation (2 min à 10 000 g), le culot est repris dans le tampon Nuclei Lysis Solution (0,8 mL). Une incubation de 5 min à 80°C est réalisée. Un ajout de 5 µL de tampon RNase (4 $mg.mL^{-1}$) est effectué. Après une incubation de 30 à 60 min à 37°C, il est rajouté 200 µL de Protein Precipitation Solution. Le milieu est mélangé 20 s à l'aide d'un vortex puis placé dans la glace pendant 5 min.

Après centrifugation de 3 min à 10 000 g, le surnageant est transvasé dans un microtube contenant 800 µL d'isopropanol. Ce tube est doucement agité par retournement jusqu'à l'obtention d'une

masse visible d'ADN, puis la solution est centrifugée 2 min à 10 000 g à 4°C. Après élimination du surnageant, l'ADN est rincé dans 800 µL d'éthanol à 70% (v/v). Cette solution est alors centrifugée 2 min à 10 000 g. Le culot ainsi obtenu est séché à l'air libre. L'ADN est alors repris dans de l'eau Milli-Q (20 à 50 µL), mis à 4°C pendant 12 h, puis conservé à -20°C.

La durée totale de l'extraction est d'environ 2 h. L'ADN est quantifié par spectrophotométrie à l'aide d'un biophotomètre (Eppendorf, Le Pecq, France). Les rapports des absorbances (260nm/280nm et 260nm/230nm) sont déterminés afin d'évaluer la qualité des ADN extraits.

2.2.2. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

La méthode moléculaire ARDRA ciblée sur le gène 16S codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal a été utilisée. Elle permet la classification de nombreuses familles et espèces. Cette méthode est en effet fondée sur le principe que les ARNr 16S des différentes espèces de Procaryotes ont divergé à partir d'une seule séquence d'ARNr, celle d'un ancêtre commun. Les mutations accumulées au cours de l'évolution ont ainsi pu conduire à des ARNr 16S avec des séquences conservées et des séquences variables permettant l'obtention de profils de restriction différents selon les espèces étudiées. Le protocole expérimental est inspiré des travaux de Rodas *et al.* (2003) et de Marques *et al.* (2010) et permet l'identification d'isolats de bactéries lactiques à partir des échantillons du vin.

Dans un premier temps, les amplicons d'environ 1500 paires de bases correspondant à la totalité de la région d'ADN codant pour l'ARNr 16S des différentes espèces sont obtenus en utilisant un couple d'amorces universelles encadrant la région de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (Ulrike *et al.,* 1989) :

- pA : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

- pH : 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, USA) selon les conditions de PCR données ci-dessous :

▪Première étape :	- Dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min	1 cycle
▪Deuxième étape :	- Dénaturation à 94°C pendant 30 s ; - Hybridation à 56°C pendant 30 s ; - Elongation à 72°C pendant 60 s.	30 cycles
▪Troisième étape :	- Elongation finale à 72°C pendant 5 min	1 cycle

La composition du mélange réactionnel (volume final 50 µL) est donnée ci-dessous :

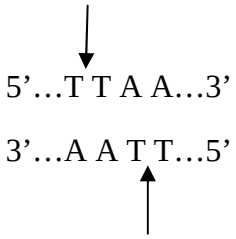
	C initiale de la solution mère	V prélevé	C finale dans le mélange réactionnel
Eau Milli-Q		qsp 50 µL	
5X tampon GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)		10 µL	
$MgCl_2$, 6 H_2O	25 mM	4 µL	2 mM
dNTP (mix)	10 mM (chaque)	1 µL	0,2 mM
Amorce pA	10 µM	5 µL	1 µM
Amorce pH	10 µM	5 µL	1 µM
Taq polymerase (Promega)	5 $U.\mu L^{-1}$	0,5 µL	0,05 $U.\mu L^{-1}$
ADN	50-100 $ng.\mu L^{-1}$	1 µL	1-2 $ng.\mu L^{-1}$

C = concentration ; V = volume

Les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse (migration pendant 45 min à 105 Volts) dans un gel d'agarose à 2% contenant 5 µL de bromure d'éthidium (BET) à 10 $mg.mL^{-1}$. Le tampon d'électrophorèse utilisé est du TAE 1X (Tris-acétate 0,04 M, EDTA 0,001 M). La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison avec un marqueur de taille connue (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, Fermentas, France). Les profils sont analysés à l'aide du logiciel BioRad Image Lab.

Pour les bactéries lactiques (*Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*), une bande caractéristique entre 1300 et 1500 paires de bases est obtenue.

Pour différencier les genres ou espèces, une digestion enzymatique est alors réalisée avec l'enzyme de restriction *Mse*I dont le site de coupure est le suivant :



Le mélange réactionnel de restriction (volume final 20 µL) a la composition suivante :

Produit de PCR	10 µL
Eau Milli-Q stérile	7 µL
Tampon de l'enzyme	2 µL
Enzyme *Mse* I (10 000 $U.mL^{-1}$)	1 µL

Le mélange réactionnel est incubé durant 16 h à 37°C.

Après restriction, on obtient des profils de restriction par électrophorèse (migration pendant 60 min à 105 Volts) en gel d'agarose à 2% (m/v) dans un tampon d'électrophorèse TAE 1X. La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison avec un marqueur de taille 100 pb (GeneRuler^{TM} 100 pb DNA Ladder, Fermentas, France). Les profils sont analysés à l'aide du logiciel BioRad Image Lab.

3 - Milieux et conditions de culture

3.1. Isolement, repiquage, conservation

Pour l'isolement, le repiquage et la conservation des bactéries, le milieu LAC est utilisé. Sa composition est la suivante : 33 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 0,6 $mL.L^{-1}$ de Tween 80, 0,08 $g.L^{-1}$ de $MnSO_4$, H_2O et 78 $mL.L^{-1}$ de jus de raisin blanc (Pampryl). Le pH est ajusté à 5,3 et la température d'incubation est de 28°C.

Pour le milieu LAC solide, 20 $g.L^{-1}$ d'agar sont rajoutés. Pour inhiber le développement des levures éventuellement présentes dans le vin, 5 $mL.L^{-1}$ de Delvocid à 1% (m/v) sont rajoutés au

milieu LAC lorsque la température du milieu après son autoclavage (20 min à 120°C) est redescendue autour de 50-55°C.

3.2. Milieu pour galerie API 50 CH

Pour les galeries API 50 CH, le milieu FT80 (Cavin *et al.*, 1989) a été modifié par l'élimination de l'acide D,L-malique et des sucres (glucose et fructose). Sa composition est la suivante : 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de viande, 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 0,6 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 0,45 $g.L^{-1}$ de KCl, 0,13 $g.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 2 H_2O, 3 $mg.L^{-1}$ de $MnSO_4$, H_2O, 0,13 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 7 H_2O et 1 $mL.L^{-1}$ de Tween 80.

3.3. Milieu pour caractériser les auxotrophies vis-à-vis des acides aminés

Le milieu chimiquement défini par Terrade *et al.* (2009) a été utilisé (milieu MCD). Sa composition est donnée dans le tableau IX. Il contient 44 composés : sources de carbone, sels minéraux, sources azotées sous forme uniquement d'acides aminés et de nucléotides et des vitamines.

Pour la préparation du milieu MCD, 11 solutions mères ont été utilisées. La préparation des solutions mères est détaillée dans l'Annexe 1.

Le milieu est stérilisé par filtration sur membrane millipore (Express^{TM} plus) de porosité 0,22 µm puis conservé à 4°C.

Tableau IX - Composition du milieu chimiquement défini (MCD)

Composé	Concentration finale ($g.L^{-1}$) dans le milieu	Concentration ($g.L^{-1}$) dans la solution mère
D-Ribose	10	100
$MnSO_4.4H_2O$	0,1	10
$MgSO_4.7H_2O$	0,1	10
K_2HPO_4	1	50
$CaCl_2$	0,44	100
Acide 4-aminobenzoïque	1.10^{-4}	0,1
Biotine	2.10^{-3}	1 (50% NaOH 1M)
Chlorure de Choline	2.10^{-3}	1
Cyanocobalamine	1.10^{-4}	0,1
Acide folique	2.10^{-3}	(10% HCl 1M)
Acide nicotinique	2.10^{-3}	1
Ca-D-pantothénate	2.10^{-3}	1
Pyridoxine HCl	2.10^{-3}	1
Riboflavine	2.10^{-3}	1 (10% HCl 1M)
Thiamine.HCl	1.10^{-3}	1
Adenine sulfate	1.10^{-3}	1
Guanine HCl	10.10^{-3}	1 (10% HCl 1M)
Cytosine	10.10^{-3}	1
Thymine	10.10^{-3}	1
Uracile	10.10^{-3}	1
Xanthine	5.10^{-3}	1 (10% NaOH 1M)
L-Alanine (Ala)	0,2	10
L-Arginine (Arg)	0,75	10
L-Asparagine (Asn)	0,15	10
Acide L-aspartique (Asp)	0,35	4 (2,5% HCl 1M)
L-Cystéine (Cys)	0,2	5 (10% HCl 1M)
Acide L-glutamique (Glu)	0,5	10 (10% HCl 1M)
L-Glutamine (Gln)	0,2	10
L- Glycine (Gly)	0,5	50
L-Histidine (His)	0,5	10
L-Isoleucine (Ileu)	0,2	10
L-Leucine (Leu)	0,2	10
L-lysine 2 HCl (Lys)	0,25	10
L-Méthionine (Met)	0,15	5 (10% HCl 1M)
L-Phénylalanine (Phe)	0,2	10
L-Proline (Pro)	0,5	10
L-Sérine (Ser)	0,4	10
L-Thréonine (Thr)	0,35	10
L-Tryptophane (Trp)	0,2	10
L-Tyrosine (Tyr)	0,2	5 (10% NaOH 1M)
L-Valine (Val)	0,2	10
$CuSO_4.5\ H_2O$	15.10^{-6}	0,01
$FeSO_4.7\ H_2O$	20.10^{-3}	5
$ZnSO_4.7\ H_2O$	135.10^{-3}	0,25

3.4. Milieux pour évaluer la production d'amines biogènes

Deux milieux ont été utilisés :

- le milieu chimiquement défini (MCD) ajusté à pH 4 et à pH 5,3 à l'aide de HCl 6M ou KOH 3M.
- un vin blanc ajusté à pH 3,5 et à pH 4,5 à l'aide de HCl 6M ou KOH 3M.

Ce vin a été élaboré à partir d'un moût de raisins du cépage Chardonnay, obtenu lors du millésime 2010 sur le domaine expérimental de l'Université de Bourgogne à Marsannay-la-Côte (21), et conservé à -18°C.

Une fois le moût de raisin décongelé, une centrifugation a été nécessaire pour clarifier le jus (10 min à 5 000 g). La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour la fermentation alcoolique est une souche commerciale sélectionnée par l'IUVV, vendue sous le nom de Levuline BRG YSEO par OENOFRANCE (Bordeaux, France). Le moût a été ensemencé à l'aide d'une pré culture en milieu YPD (20 $g.L^{-1}$ de glucose, 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 10 $g.L^{-1}$ de Bacto peptone) à raison de 10^5 $levures.mL^{-1}$, incubé à 28°C sous une vitesse d'agitation de 110 rpm. La croissance des levures est suivie en réalisant quotidiennement un comptage des levures vivantes et mortes sur cellule de Thoma, après coloration au bleu de méthylène (0,01% m/v dans 20 $g.L^{-1}$ de citrate trisodique). L'évolution de la fermentation alcoolique est suivie par l'évolution de la teneur en sucres réducteurs du milieu. La méthode utilisée est la méthode colorimétrique au DNS (Miller, 1959) qui consiste en la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique par les extrémités réductrices des sucres à 100°C. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm et les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir d'une gamme étalon établie à l'aide de glucose entre 0 et 5 $g.L^{-1}$.

L'éthanol est déterminé par ébulliométrie à l'aide d'un ébulliomètre Dujardin-Salleron. Le glucose et le fructose sont dosés par méthode enzymatique (Biosentec, Toulouse, France). Le D-Glucose et le D-Fructose sont phosphorylés en D-glucose-6-phosphate (G-6-P) et D-fructose-6-phosphate (F-6-P) respectivement, par l'enzyme hexokinase (HK), en présence de l'ATP transformé simultanément en ADP :

(1) D-Glucose + ATP $\longrightarrow$ G-6-P + ADP

(2) D-Fructose + ATP $\longrightarrow$ F-6-P + ADP

Ensuite le G-6-P est oxydé en D-gluconate-6-phosphate par le NADP, en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6P-DH). Le NADP est alors réduit en NADPH (3).

(3) G-6-P + NADP $\longrightarrow$ D-gluconate-6-phosphate + NADPH + H^+

La quantité de NADPH formée, déterminée par la mesure de l'absorbance à 340 nm, dans cette réaction est proportionnelle à la quantité de D-Glucose. Une fois la réaction (3) terminée, le F-6-P est converti en G-6-P par la Phosphoglucose isomérase (PGI) (4).

(4) F-6-P $\longleftrightarrow$ G-6-P

Le G-6-P réagit à son tour avec le NADP pour former le D-gluconate-6-phosphate et NADPH. La quantité de NADPH formée dans cette réaction est proportionnelle à la quantité de D-Fructose.

L'acide L-malique est dosé par méthode enzymatique (Biosentec, Toulouse, France). En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD+), l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par la L-malate déshydrogénase (L-MDH). L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens L-malate $\rightarrow$ oxaloacétate. En présence du L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate (2) par la glutamate -oxaloacétate-transaminase (GOT).

(1) L-malate + NAD^+ $\longleftrightarrow$ oxaloacétate + NADH + H^+

(2) oxaloacétate + L-glutamate $\longleftrightarrow$ L-aspartate + α-cétoglutarate

La formation de NADH mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm est proportionnelle à la quantité de L-malate consommée.

La durée de la fermentation alcoolique est de 175 h. La composition du milieu vin ainsi obtenu est donnée dans le tableau X.

Tableau X - Composition du vin après la fermentation alcoolique

Ethanol	11,7 % (v/v) ± 0,2
Sucres réducteurs	- de 2 $g.L^{-1}$
Glucose	0,05 $g.L^{-1}$± 0,01
Fructose	0,20 $g.L^{-1}$ ± 0,02
Acide L-malique	4,1 $g.L^{-1}$ ± 0,1

La détermination de la composition et de la concentration des acides aminés libres et des acides aminés liés (constitutifs des peptides et protéines) a été réalisée selon la méthode décrite par Guilloux-Benatier et Chassagne (2003). Les acides aminés liés sont le résultat de la différence entre les acides aminés totaux et les libres. En raison de la conversion partielle durant l'hydrolyse acide de l'asparagine et de la glutamine en leurs acides correspondants, on exprime conventionnellement pour les acides aminés liés leurs teneurs en Asx (Asp + Asn) et Glx (Glu + Gln). Les résultats sont rassemblés dans le tableau XI.

Avant ensemencement bactérien, le vin est filtré stérilement sur membrane Millipore de porosité 0,22 μm. Tous les essais de culture bactérienne ont été réalisés en double.

Tableau XI - Composition azotée du vin en fin de fermentation alcoolique

	Acides aminés libres				Acides aminés liés	
	mg.L^{-1}		mg N.L^{-1}		mg.L^{-1}	mg N.L^{-1}
Asp	12,1	(0,3)	1,3	(0,0)	-	-
Glu	20,2	(0,6)	1,9	(0,1)	-	-
Asx	-		-		47,5	3,5
Glx	-		-		125,1	11,8
Ser	7,4	(0,5)	1,0	(0,1)	35,8	4,8
Asn	14,2	(0,8)	3,0	(0,2)	-	-
Gly	5,2	(0,3)	1,0	(0,1)	31,0	5,8
Gln	1,7	(0,4)	0,3	(0,1)	-	-
His	7,2	(0,3)	2,0	(0,1)	9,4	2,5
Thr	8,7	(0,5)	1,0	(0,1)	33,4	3,9
Arg	23,8	(0,7)	7,6	(0,2)	18,2	5,9
Ala	21,1	(0,8)	3,3	(0,1)	30,3	4,8
Gaba	55,9	(2,1)	7,6	(0,3)	0,0	0,0
Pro	719,3	(31,4)	87,5	(3,8)	80,0	9,7
Tyr	6,8	(0,3)	0,5	(0,0)	16,3	1,3
Cys	4,2	(1,2)	0,5	(0,1)	2,0	0,2
Val	9,2	(0,7)	1,1	(0,1)	36,4	4,3
Met	4,8	(0,7)	0,5	(0,1)	0,6	0,1
Ileu	2,7	(0,2)	0,3	(0,0)	23,9	2,5
Leu	21,3	(1,5)	2,3	(0,2)	27,5	2,9
Lys	21,0	(1,2)	4,0	(0,2)	31,5	6,0
Phe	11,2	(0,4)	0,9	(0,0)	16,1	1,4
Total			127,6			71,4

(les chiffres entre parenthèses correspondent aux écarts-type)

4 - Criblage des souches possédant des gènes codant pour des activités décarboxylases.

La présence des gènes est testée par PCR, après extraction de l'ADN des souches. Tous les essais on été effectués en présence d'une souche témoin possédant le gène cible :

- *L. brevis* IOEB 9809 pour le gène *tyrdc* codant la tyrosine décarboxylase (Coton et Coton, 2005) et pour le gène *agdi* codant l'agmatine déiminase (Coton *et al.*, 2010)
- *O. oeni* IOEB 0610 pour le gène *hdcA* codant l'histidine décarboxylase (Bonnin-Jusserand, 2011)

- *O. oeni* BR1497 pour le gène *odc* codant l'ornithine décarboxylase (Bonnin-Jusserand, 2011)
- *O. oeni* Div7.12 pour les gènes de la voie ADI : *arcA* codant l'arginine déiminase, *arcB* l'ornithine transcarbamoylase, *arcC* la carbamate kinase et *arcD1* et *arcD2* un transporteur (Divol *et al.*, 2003)

L'extraction de l'ADN des souches bactériennes a été réalisée selon le protocole décrit en 2.2.1. Le tableau XII rassemble les gènes à amplifier, les amorces utilisées et les tailles des bandes du produit de PCR.

Tableau XII - Gènes à amplifier, amorces utilisées et tailles des bandes du produit de PCR

Gènes	Nom des amorces et séquences utilisées		Taille du produit de PCR
tyrdc	TD2 TD5	ACATAGTCAACCATR TTGAA CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3'	1133 pb
hdcA	HDCA F HDCA R	GTCAGAGTTTGATAAAAAGTTG GTATTCAACTAAAG TATCTTGTAA	402 pb
odc	ODC V1 ODC V3	A ATAAGAGTTTACAT TGGGGAA TGAGTTTCTGCAGGTGTCATT	1828 pb
arcA	ADIOO5' ADIOO3'	ATGATGGATAAGAAAGTTCC -F CTATTTTTTAATATCATCACG -R	1247 pb
arcB	OTCOO 5' OTCOO 3'	ATGGAACAAAAGTTAGG - F TTAAACATGCGGAATAAAC - R	1056 pb
arcC	CKOO5' CKOO3'	ATGGCAAATAGAAAAATTGTGG - F CTACTTTGTGATAATCGTTCC - R	941 pb
arcD1	B11 B12bis	ATGTTTTCCTTTTTAATTACTGC - F TAAAAGCATTAGTAAAAG - R	236 pb
arcD2	B5 B6	TGTTCTCTCGATTAATTTGG - F AGCACATAAATTGCAAGC - R	588 pb
agdi	AgD1 A	5'-CAYGTNGAYGGHSAAGG-3' 5'-TGTTGNGTRATRCAGTGAAT-3'	600 pb

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur Bio-Rad ; les conditions de PCR retenues sont données ci-dessous :

Première étape : - Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min

Deuxième étape :

- Pour TD2 et TD5 : - Dénaturation à 94°C pendant 30 s
  - Hybridation à 52°C pendant 30 s
  - Elongation à 72°C pendant 1 min 15 s

  } 30X

- Pour HDCA F et HDCA R : - Dénaturation à 94°C pendant 30 s
  - Hybridation à 52°C pendant 30 s
  - Elongation à 72°C pendant 30 s

  } 30X

- Pour ODC V1 et ODC V3 : - Dénaturation à 95°C pendant 30 s
  - Hybridation à 55°C pendant 30 s
  - Elongation à 72°C pendant 3 min

  } 30X

- Pour OTCOO F et OTCOO R, ADIOO F et ADIOO R, CKOO F et CKOO R, B11 F et B12bis R, B5 F et B6 R :

  - Dénaturation à 94°C pendant 30 s
  - Hybridation à 45°C pendant 30 s
  - Elongation à 72°C pendant 1 min 30 s

  } 35X

- Pour AgD1 et AgD2 : - Dénaturation à 94°C pendant 30 s
  - Hybridation à 56°C pendant 45 s
  - Elongation à 72°C pendant 45 s

  } 30X

Troisième étape : - Elongation finale à 72°C pendant 15 min.

La composition du mélange réactionnel est donnée ci-dessous :

	C initiale de la solution mère	V prélevé	C finale dans le mélange réactionnel
Eau Milli-Q		qsp 24 µL	
5X tampon GoTaq® Flexi DNA Polymerase Promega		5 µL	
$MgCl_2$, 6 H_2O	25 mM	1,5 µL	1,5 mM
dNTP (mix)	10 mM (chaque)	0,5 µL	0,2 mM
Amorce F*	10 µM	2,5 µL	1 µM
Amorce R*	10 µM	2,5 µL	1 µM
Taq polymerase (Promega)	5 $U.\mu L^{-1}$	0,2 µL	0,04 $U.\mu L^{-1}$
ADN	50-100 $ng.\mu L^{-1}$	1 à 2 µL	2,1- 4,2 $ng.\mu L^{-1}$

F : forward primer, R : reverse primer C = concentration, V = volume

Les produits de PCR sont mis à migrer par électrophorèse dans les conditions décrites en 2.2.2.1. La révélation sous UV et la photographie des gels ont été faites à l'aide de l'appareil Bio-Rad munie d'une imprimante.

5 - Caractérisation des auxotrophies vis-à-vis des acides aminés

La caractérisation des auxotrophies vis-à-vis de 4 acides aminés (His, Tyr, Phe, Arg) précurseurs d'amines biogènes a été faite selon la technique d'omission individuelle.

Elle consiste à préparer 4 milieux de culture en éliminant à chaque fois un des acides aminés. Pour la détermination des auxotrophies, la composition d'un litre de milieu est la suivante :

MCD complet (sans omission d'un acide aminé) :

- 263,1 mL de MCD (3,8 X)
- 1 x 50 mL de His (20 X), 1 x 50 mL de Arg (20 X), 1 x 50 mL de Tyr (20 X), 1 x 50 mL de Phe (20 X)
- 536,9 mL d'eau Milli-Q

MCD (avec omission d'un seul acide aminé) :

- 263,1 mL de MCD (3,8 X)
- 3 X 50 mL (20 X) : Arg + His + Phe ; His + Phe + Tyr ; Phe + Tyr + Arg ; Tyr + Arg + His.
- 586,9 mL d'eau Milli-Q

Les souches sont pré-cultivées dans le milieu LAC (pH 5) pendant 72 h à 28°C.

1 mL de milieu est centrifugé pendant 10 min à 5000 g à 4°C. La biomasse obtenue est ensuite lavée avec de l'eau physiologique deux fois de suite, puis conservée dans l'eau physiologique.

Les ensemencements du MCD complet (culture témoin) ou du MCD avec un acide aminé omis sont réalisés dans des tubes de 5 mL avec une concentration initiale en bactéries de 4.10^6 $UFC.mL^{-1}$.

Chaque expérience est réalisée au minimum en triplicat. L'incubation a lieu à 28°C pendant 48 à 168 h. L'absorbance à 600 nm de chaque culture est mesurée, et le pourcentage de biomasse obtenue par rapport à celle obtenue dans un milieu complet est calculé.

6 - Mesure des activités enzymatiques

6.1. Préparation des extraits cellulaires

Aux différentes phases de la croissance bactérienne dans un milieu LAC à pH 5,3 : début, milieu et fin de phase exponentielle de croissance, 1000 mL de milieu ont été centrifugés (7 000 g, 15 min, 4°C). Le culot bactérien obtenu est lavé avec de l'eau physiologique, puis repris dans 10 mL de tampon MES (acide 2-morpholino éthanesulfonique) 50 mM, $MgSO_4$ 10 mM pH 5,6.

Les cellules sont cassées par pression avec un broyeur à haute pression (3 passages à 0.8 kb) (Constant system, Angleterre). Il est nécessaire de refroidir le surnageant dans la glace entre les passages. A cette pression la température peut en effet augmenter rapidement ce qui dénature les protéines et donc les activités enzymatiques. Les cellules non cassées et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 14 000 g à + 4°C pendant 10 min.

6.2. Dosage des protéines dans les extraits

La concentration en protéines dans les extraits est mesurée par la méthode de Bradford (dosage colorimétrique à 595 nm). Une gamme d'étalonnage (0 à 15 mg.L^{-1}) est réalisée à partir de sérum albumine bovine (BSA). Les échantillons sont mélangés au réactif de Bradford (Bio-Rad) dilué au 1/5 dans un volume final de 1 mL. Après une incubation de 15 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre Bio-Rad (SmartSpec™ Plus). Les concentrations sont calculées à l'aide de la courbe étalon obtenue avec la BSA (Fig. 5).

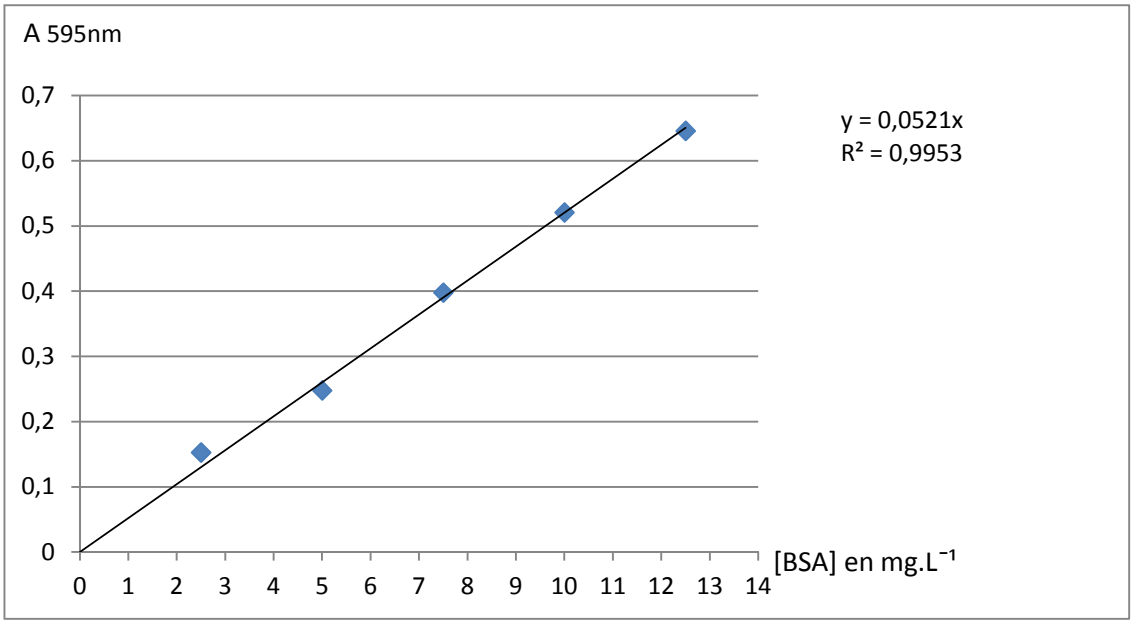


Fig. 5 - Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford

6.3. Mesure des activités enzymatiques décarboxylases

L'activité enzymatique est mesurée dans un tampon citrate-phosphate pH 5,3 (Moreno-Arribas et Lonvaud-Funel, 1999). Les deux tampons sont préparés ainsi :

- tampon Na_2HPO_4 à 0,1 M, EDTA 1 mM et DTT 1 mM

- tampon citrate à 0,1M, EDTA 1 mM et DTT 1 mM puis mélangés jusqu'au pH voulu.

Une solution de BSA à 10 $g.L^{-1}$ est préparée, ainsi qu'une solution de pyridoxal-5'-phosphate (PLP) à 1 mM.

Pour un volume réactionnel de 5 mL sont ajoutés : 25 $mg.L^{-1}$ de BSA, 0,5 µM de PLP, 2,5 mL de surnageant et le tampon citrate-phosphate qsp 5 mL. Le mélange réactionnel est incubé 60 min à 35°C afin que l'enzyme se stabilise dans sa conformation active (Bonin-Jusserand, 2011). L'acide aminé précurseur est ensuite ajouté à 3,6 mM. L'incubation dure 3 h à 35°C. La réaction enzymatique est stoppée en ajoutant 1,75 mL de tampon borate 1M pH 9, et 750 µL de méthanol par mL de produit final (dans un vial de 4 mL à bouchon à vis). La concentration des amines biogènes formées est ensuite mesurée par HPLC.

7 - Dosage des amines biogènes et des acides aminés par HPLC

7.1. Appareillage

Un appareil de chromatographie liquide à haute performance (LaChrom Elite® VWR Hitachi, Japon) est utilisé pour doser les amines biogènes et les acides aminés des différents milieux de culture. Cet appareil est composé des parties suivantes (Fig. 6) :

- Un système de pompage qui comprend une double pompe configurée en série, commandée par microprocesseur ;
- Un système d'injection avec une capacité d'injection de 0,1 à 90 µL ;
- Un détecteur UV à une haute sensibilité, la source de lumière est une lampe au deutérium, la plage de longueurs d'ondes est située entre 190 et 600 nm ;
- Une colonne Alltima ^{TM} HP C18-HL ;
- Le système est piloté par un logiciel de données chromatographiques EZChrom Elite.

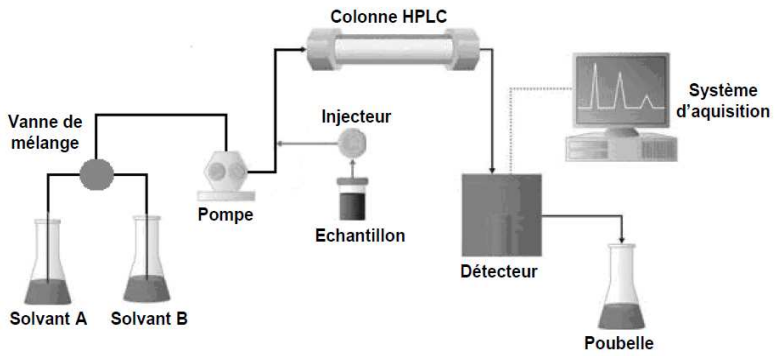


Fig. 6 - Schéma d'un appareil de chromatographie liquide à haute Performance (http://www.waters.com)

Le système de pompage assure l'élution des solvants en mode gradient (compositions variables au cours du temps). Ce système doit répondre à un certain nombre de critères :

- Le débit doit être constant et reproductible ;
- Le mélange des différentes compositions du solvant lors de gradients doit être reproductible et efficace ;
- Les pompes doivent supporter des hautes pressions (400 bars environ).

7.2. Dérivation au DEEMM

La méthode de dosage par HPLC est décrite par Gomez-Alonso *et al*. (2007). Une étape de dérivation est nécessaire, afin de détecter les amines. L'agent dérivant utilisé est le diéthyl éthoxyméthylènemalonate noté DEEMM (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Il réagit avec les fonctions NH_2 pour former des aminoénones. La réaction s'effectue avec : 1,75 mL de tampon borate 1M pH 9, 750 µL de méthanol, 1 mL d'échantillon à doser, 40 µL de standard interne (2,4,6-triméthylphénéthylamine hydrochloride) à 2 $mg.mL^{-1}$ dans HCl 0,1N, stocké à 4°C, et 30 µL de DEEMM. Le mélange réactionnel s'effectue dans des vials en verre de 4 mL munis d'un bouchon à vis. Le mélange est vigoureusement secoué pour homogénéiser la réaction car le DEEMM est visqueux et forme des bulles. Les solutions sont ensuite placées dans un bain à ultra sons pendant 30 min (les vials sont agités toutes les 5 min) puis placées 90 min à 70°C pour éliminer le DEEMM en excès.

7.3. Analyse par HPLC

La séparation des molécules s'effectue en chromatographie phase inverse en utilisant la colonne C18-HL (Alltima ^{TM} HP) aux caractéristiques suivantes : (250 x 4.6 mm di), granulométrie de 5 µm. Cette colonne est « High load » (HL) ce qui signifie un fort taux de greffage. Elle est munie d'une pré-colonne C18 HL (7,5 x 4,6 mm di), granulométrie 5 µm.

L'élution s'effectue avec un gradient binaire composé d'un tampon A : acétate d'ammonium 10 mM et azide de sodium 0,02% pH 5,6 et d'un tampon B : 80% d'acétonitrile et 20% de méthanol (Fig. 7).

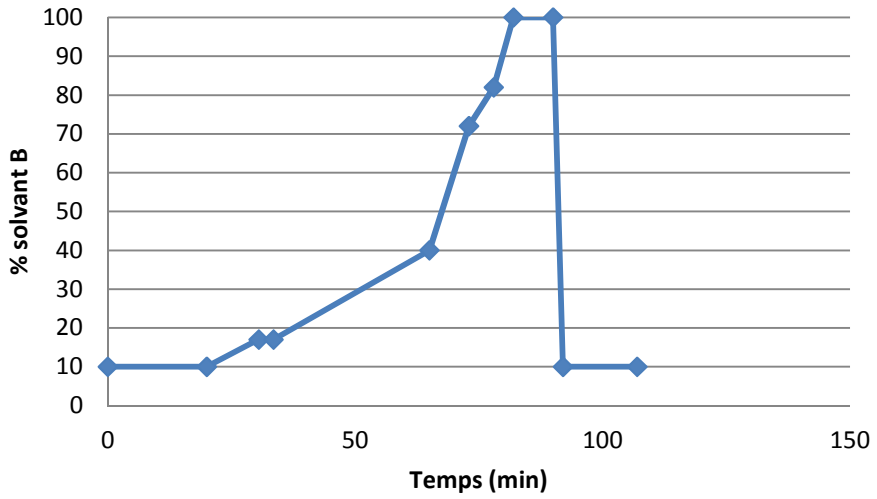


Fig. 7 – Evolution du pourcentage de solvant B (acétonitrile - méthanol 8 /2) lors de l'analyse par HPLC

La durée totale de chaque injection est de 120 min, le volume d'injection est de 50 µL et le débit de 0,9 mL.min^{-1}. La détection s'effectue à 280 nm au DAD (barrette de diode). Le profil chromatographique obtenu sur les solutions standards est représenté en Annexe 2.

L'attribution des pics a été réalisée par l'injection individuelle de chaque amine ou acide aminé. Ensuite, afin de quantifier les teneurs en amines ou acides aminés, des solutions contenant des concentrations croissantes en acides aminés d'une part et en amines biogènes d'autre part ont été injectées afin d'établir des droites d'étalonnage pour chaque composé. La figure 8 montre les pourcentages d'erreur obtenus pour l'agmatine aux différentes concentrations testées.

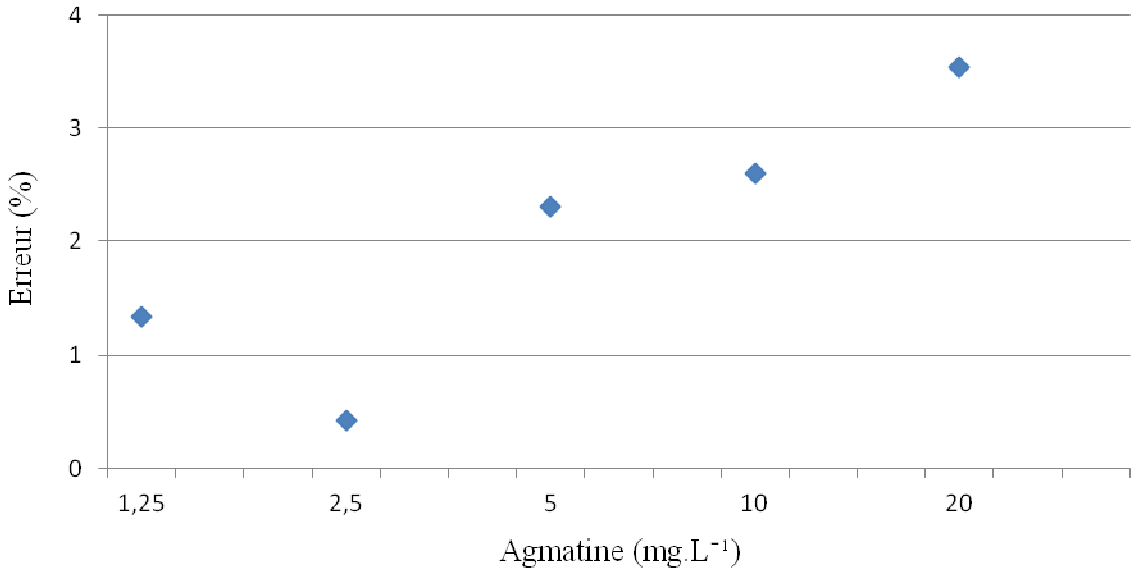


Fig. 8 - Pourcentage d'erreur sur le dosage de l'agmatine en fonction de la concentration

8 - Détermination de l'effet d'un ajout d'agmatine dans un vin sur la perception olfactive

8.1. Vins étudiés

Deux types de vins provenant du domaine de l'Université de Bourgogne à Marsannay-la-Côte ont été utilisés : un vin rouge et un vin blanc (millésime 2010). Le vin rouge est issu du cépage Pinot noir et le vin blanc du cépage Chardonnay.

8.2. Réactifs et concentrations étudiées

Le sulfate d'agmatine et le sulfate d'ammonium ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Les concentrations de sulfate d'ammonium ont été calculées pour égaler à chaque fois la quantité d'ion sulfate apportée lors de l'ajout d'agmatine sous forme de sulfate d'agmatine. Par exemple, 120 $mg.L^{-1}$ d'agmatine sont apportés par 207,1 $mg.L^{-1}$ de sulfate d'agmatine ; cette teneur apportera donc 87,1 $mg.L^{-1}$ d'ions sulfates. Pour avoir cette même quantité dans l'expérience qui

veut voir si les ions sulfates ont un impact sur le vin, il faudra alors apporter 119,9 $mg.L^{-1}$ de sulfate d'ammonium.

8.3. Panel de dégustateurs

Le panel est composé de 20 personnes de l'Institut : enseignants-chercheurs et étudiants (Diplôme National d'œnologue $1^{ère}$ et $2^{ème}$ années).

8.4. Procédure expérimentale

8.4.1. Nécessité d'étudier l'effet de l'ajout d'ions sulfate.

L'agmatine se présente sous forme de poudre solide de sulfate d'agmatine. Il est donc important d'étudier d'abord un éventuel impact du sulfate sur la perception olfactive du produit, afin de se concentrer ensuite uniquement sur l'effet de l'agmatine. Dans une première série, du sulfate d'ammonium sera donc ajouté dans les vins de manière à avoir la même quantité de sulfate que celle apportée par la poudre de sulfate d'agmatine pour les concentrations en agmatine souhaitées. Cela permettra de vérifier que le sulfate aux concentrations de l'étude ne modifie pas l'arome du vin, et donc que les éventuels effets observés sont bien dus exclusivement à l'agmatine.

8.4.2. Protocole expérimental pour le sulfate d'ammonium et pour le sulfate d'agmatine.

L'effet sensoriel de l'ajout de sulfates ainsi que de l'agmatine ont été étudiés au moyen de tests triangulaires entre le vin sans ajout et le vin avec ajout de la molécule cible. Ce test consiste à présenter les deux échantillons à comparer, l'un étant doublé et l'autre pas. Les dégustateurs doivent indiquer, parmi les trois échantillons proposés, lequel n'est pas doublé.

Deux séries de test triangulaires ont été organisées afin d'évaluer dans un premier temps l'impact ou non du sulfate (sous forme de sulfate d'ammonium) sur la perception olfactive du vin et dans un deuxième temps pour évaluer l'effet de l'ajout de l'agmatine (sous forme de sulfate d'agmatine). Pour chaque série, quatre tests triangulaires sont réalisés sur chaque vin

(Chardonnay et Pinot noir). La série de 4 triangulaires correspondant à l'ajout d'agmatine sur du vin blanc a été doublé avec le même panel afin de corroborer les résultats obtenus. Les échantillons étaient évalués par voie orthonasale exclusivement. En effet, étant donné qu'aucune étude n'a encore été faîte sur les effets allergènes de l'agmatine, il était nécessaire pour la santé des dégustateurs d'évaluer les vins uniquement olfactivement. Après chaque triangulaire les dégustateurs étaient invités à faire des commentaires sur leurs critères de choix. Ces commentaires n'ont pas été analysés de façon systématique. Le questionnaire utilisé est présenté sur la figure 9.

Description de l'essai :
Pour chaque série, veuillez examiner **OLFACTIVEMENT** les trois échantillons dans l'ordre que vous désirez, puis notez **le** numéro de l'échantillon que vous trouvez différent.
Il est indispensable que vous fassiez un choix. Vous pouvez, si vous le désirez, faire un commentaire pour chaque série (descripteurs aromatiques, critères de choix).

Ordre de dégustation

Série 1 :	X	X	X
Série 2 :	X	X	X
Série 3 :	X	X	X
Série 4 :	X	X	X

Résultats de vos tests :

Pour la Série 1

N° : Commentaires :

Pour la Série 2

N° : Commentaires :

Pour la Série 3

N° : Commentaires :

Pour la Série 4

N° : Commentaires :

Fig. 9 - Questionnaire d'évaluation sensorielle

8.5. Conditions pratiques de réalisation

Une solution mère est préparée dans les deux expériences et diluée par la suite dans les vins aux concentrations souhaitées. Les tests sont réalisés dans la salle d'évaluation sensorielle de l'IUVV. Les échantillons sont présentées dans des verres correspondant aux normes AFNOR codées avec des nombres aléatoires à trois chiffres et recouverts d'une coupelle pour mieux conserver les arômes des échantillons (AFNOR, 1995). Quatre tests triangulaires étaient présentés dans chaque poste soit 12 verres remplis avec 100 mL de vin chacun. Au sein de chaque triangulaire, les 6 ordres de présentations possibles étaient relativement bien équilibrés (trois ou quatre présentations pour chaque combinaison).

Les résultats sont traités statistiquement en confrontant le nombre de réponses justes à la valeur trouvée sur la loi binomiale 1/3 pour un risque de 5% et pour le nombre de participants de l'épreuve.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I - Relation entre auxotrophies vis-à-vis de 4 acides aminés précurseurs d'AB et production des AB correspondantes.

Cette étude va consister à sélectionner des souches indigènes de bactéries lactiques potentiellement productrices d'amines biogènes et notamment de putrescine, histamine, tyramine et phényléthylamine, diverses amines régulièrement dosées dans des vins finis.
Les bactéries lactiques du vin et notamment *O. oeni* présentent de nombreuses auxotrophies vis-à-vis des acides aminés. Une question se pose alors :
une bactérie auxotrophe vis-à-vis d'un acide aminé précurseur d'une amine biogène produit-elle plus de cette amine en présence de cet acide aminé qu'une souche non auxotrophe vis-à-vis de cet acide aminé ?

1 - Choix des souches bactériennes

Les 80 souches indigènes isolées à partir de 3 vins rouges, sont des Gram + se présentant toutes sous forme de coques plus au moins en chainettes.

1.1. Recherche de la présence des gènes d'intérêt

La présence de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la production d'amines biogènes a été effectuée sur ces 80 souches. Nous avons dans un premier temps recherché la présence du gène *tyrdc* codant la tyrosine décarboxylase et formant ainsi la tyramine, du gène *hdc* codant l'histidine décarboxylase et formant alors l'histamine, du gène *agdi* codant l'agmatine déiminase, des gènes *arcA, arcB, arcC, arcDI* et *arcD2* codant la voie ADI (arginine déiminase) et du gène *odc* codant pour l'ornithine décarboxylase qui conduit à la formation de putrescine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII et quelques exemples de profils de PCR obtenus sont présentés dans l'Annexe 4.

Tableau XIII - Présence ou absence de gènes codant des enzymes impliquées dans la production d'amines biogènes

Gènes recherchés	*tyrdc*	*hdc*	*agdi*	*odc*	*arcA, arcB, arcC, arcD1 et arcD2*
Nombre de souches testées	80	80	80	27	5
Souches (+)	41%	6%	0%	19%	100%
Souches (+)	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41	1, 7, 16, 26, 62	-	7, 34, 26, 37, 23	7, 34, 26, 37, 23

Depuis que des primers ont été conçus pour cibler le gène codant pour la tyrosine décarboxylase, beaucoup de screening de bactéries lactiques pouvant être de potentielles productrices de tyramine ont été réalisés (Coton *et al*., 2004). Il apparait que ce gène est souvent présent chez *Lactobacillus hilgardii* et *Lactobacillus brevis*, moins fréquent chez *Lactobacillus plantarum* (Coton *et al*., 2010a ; Arena *et al*., 2007) et rarement présent chez O*enococcus oeni* (Nannelli *et al*., 2008 ; Lerm *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2010 ; Coton *et al.*, 2010a). Quelques auteurs rapportent même que *O. oeni* ne serait pas capable de produire cette amine (Guerrini *et al*., 2002 ; Moreno-Arribas *et al.*, 2000 et 2003). Pourtant d'autres études montrent la production de tyramine par cette espèce dans le vin (Gardini *et al.*, 2005 ; Rosi *et al.*, 2009). Les résultats que nous avons obtenus montrent que 41% des souches que nous avons isolées possèdent le gène *tyrdc* ; ceci ne signifie pas pour autant que ces souches seront capables de produire de la tyramine dans les milieux de culture.

Seulement 6% des souches isolées ont le gène *hdc*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Coton *et al*. (2010a) qui détectent ce gène dans seulement 10 souches sur 113 souches de *O. oeni* provenant du milieu vin. Cependant dans la littérature, les résultats sont assez contradictoires. Pour Landete *et al.* (2005a), le gène *hdc* est très présent chez *O. oeni* puisque sur 32 souches

isolées de vins espagnols 25 souches le possèdent. C'est ce qu'observent aussi Coton *et al.* (1998): 49% des vins français analysés possèdent des souches *hdc+* qui sont en fait des *Oenococcus oeni.* Par contre pour les *O. oeni* provenant de vins d'Afrique du Sud (Lerm *et al*., 2011), de vins espagnols issus du cépage Tempranillo (Ruiz *et al.,* 2010) et de vins grecs (Pramateftaki *et al*., 2012), le gène *hdc* n'a jamais été trouvé dans les souches isolées. Récemment, Garcia-Moruno et Munoz (2012) ont tenté de clarifier ce point. Pour ces auteurs, *O. oeni* n'est pas la bactérie responsable des teneurs en histamine rencontrées dans le vin. Pour eux, le gène *hdc* n'est que très rarement présent chez *O. oeni* et la plupart des souches ne possèdent pas le gène cluster *hdc*. Les résultats contradictoires trouvés dans les différentes publications pourraient s'expliquer par le fait que le cluster *hdc* est localisé sur un plasmide d'environ 100 kb (Lucas *et al*., 2008) qui est probablement instable. Ainsi on peut imaginer qu'un grand nombre de souches de *Oenococcus oeni* pourraient aisément le perdre lors de repiquages.

Aucune des souches testées ne semble avoir dans son génome le gène *agdi.* Ceci confirme les résultats de Lucas *et al.* (2007) qui montrent que ce gène n'est pas présent chez *O. oeni.* Cependant Coton *et al.* (2010a) ont récemment trouvé des souches *O. oeni agdi+* non isolées du vin mais toutes du cidre. Toutes les souches testées du vin se sont avérées être *agdi-*. La présence ou l'absence de gènes est très souche dépendante mais dépend surtout des niches écologiques. Donc dans le milieu vin si des souches de *O. oeni* sont des productrices de putrescine, ceci se fera par la voie de l'arginine déiminase, suivie ensuite de l'action de l'ornithine décarboxylase et non par la voie de l'agmatine déiminase.

19% des souches testées sont *odc+*. Le gène *odc* apparait donc aussi peu fréquent chez *O. oeni.* Seules 28 souches sur 121 souches isolées de vins portugais (Marques *et al.,* 2007), 7 souches sur 66 souches isolées de vin grecs (Pramateftaki *et al.,* 2012) et 2 souches sur 113 souches isolées de vins français (Coton *et al*., 2010a) le possèdent. Dans d'autres études, ce gène n'est pas retrouvé chez les souches d'*O. oeni* isolées (Marcobal *et al.,* 2004 ; Constantini *et al*., 2006 ; Ruiz *et al.,* 2010 ; Lerm *et al.,* 2011). Récemment, le screening de 263 souches isolées de deux matrices différentes : vin ou cidre a montré que la présence du gène *odc* apparait être très souche dépendante (Bonnin-Jusserand, 2011).

Enfin la présence du cluster *arc* et la capacité à dégrader l'arginine chez *O. oeni* est aussi très souche dépendante (Tonon *et al.,* 2001 ; Divol *et al.,* 2003). Ici dans cette étude, ce cluster est retrouvé au complet dans les 5 souches isolées que nous avons testées.

Cette étude confirme que *Oenococcus oeni* en possédant dans son génome plusieurs gènes codant des enzymes décarboxylases est bien une espèce pouvant produire des amines biogènes dans le vin. Les 5 souches possèdent à la fois les gènes de la voie ADI (cluster *arc*) et le gène *odc*, donc elles peuvent synthétiser de la putrescine à partir de l'arginine. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont trouvé des souches de *Oenococcus oeni* ADI^+/odc^- ou ADI^-/odc^+ mais aussi ADI^+/odc^+ (Mangani *et al*., 2005 ; Divol *et al*., 2003).

1.2. Croissance des souches en milieu LAC et MCD

Après une préculture en milieu LAC à pH 5,3, les 80 souches sont repiquées dans le MCD sans modification de pH.

La durée de croissance des souches sur le milieu LAC est relativement homogène. A 28°C, la fin de la phase exponentielle de croissance est atteinte pour certaines souches à 24 h et pour d'autres à 48 h. Par contre, la croissance sur MCD est très variable d'une souche à l'autre, des souches sont incapables de pousser dans le MCD tout en se développant bien dans le milieu LAC.

Le tableau XIV répertorie les souches ayant été capables de se multiplier, même lentement, sur le MCD.

18 souches indigènes sur les 80 souches isolées sont capables de se multiplier sur ce milieu et seulement 7 souches le peuvent en moins de 7 jours. Ce milieu, d'après Terrade *et al.* (2009), permet pourtant une meilleure croissance des bactéries lactiques avec des biomasses totales formées bien supérieures à celles obtenues dans d'autres milieux chimiquement définis puisque les absorbances mesurées à 750 nm par ces auteurs sont comprises entre 0,7 et 1,4. En effet, il contient à priori tous les éléments nécessaires au développement des bactéries lactiques du vin, soit 44 composés (oses, vitamines, acides aminés, bases, éléments minéraux). Nos résultats sont bien en retrait des absorbances mesurées sur ce milieu par Terrade *et al.* (2009) puisque pratiquement 8 souches sur 10 s'avèrent incapables de croissance sur ce milieu. Les souches de bactéries lactiques testées par Terrade *et al*. (2009) proviennent d'une collection de souches de la société Lallemand après vraisemblablement une sélection sur leur capacité de croissance. Nos souches proviennent de la flore indigène de 3 vins et ce milieu MCD apparait finalement peu approprié au développement des *Oenococcus oeni* indigènes.

Tableau XIV - Souches capables de se multiplier sur MCD à pH 5,3

Souches	Durée de croissance	A_{600nm} maximale	Nombre de tests effectués
63	48 h	1,77	6
34	72 h	0,44	6
7	72 h	1,24	9
23	144 h	0,33	6
39	168 h	0,43	6
26	168 h	1,57	6
37	168 h	0,33	2
64	13 j	1,51	6
1	20 j	0	9
62	20 j	0	6
16	20 j	0	6
18	20 j	0	6
40	20 j	0	6
10	20 j	0	6
3	20 j	0	6
23	20 j	0	6
59	20 j	0	6
30	20 j	0	6

1.3. Souches bactériennes retenues

5 souches sont retenues pour la suite de l'étude. Il s'agit des souches 7, 23, 26, 34 et 37 qui, sur le milieu MCD choisi, se multiplient significativement (A_{600} entre 0,3 et 1,6) et sur un temps relativement court (6 jours au maximum). De plus, elles possèdent dans leur génome des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la production des amines biogènes :

- souche 7 : *tyrdc, hdc, odc, arcA, arcB, arc, arcD1* et *arcD2*
- souches 23 : *tyrdc, odc, arcA, arcB, arc, arcD1* et *arcD2*
- souche 26 : *tyrdc, hdc, odc, arcA, arcB, arc, arcD1* et *arcD2*
- souche 34 : *tyrdc, odc, arcA, arcB, arc, arcD1* et *arcD2*
- souche 37 : *odc, arcA, arcB, arc, arcD1* et *arcD2*

Les 5 souches ont été identifiées tout d'abord à l'aide d'une galerie API 50 CH, le profil est typique de *O. oeni* (Annexe 5). Ceci a été confirmé par PCR par amplification et restriction du gène ARNr 16S. Après digestion enzymatique, les profils de restriction obtenus montrent des bandes caractéristiques du genre *Oenococcus à* 140, 200, 250 et 680 paires de bases (Rodas *et al.*, 2003). Les 5 souches appartiennent bien à l'espèce *Oenococcus oeni* (Fig. 10).

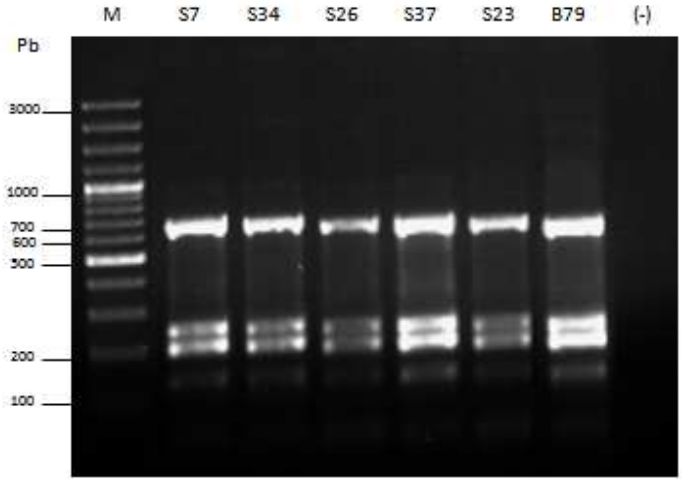


Fig. 10 - Profils obtenus par 16S- ARDRA après digestion par *Mse*I des 5 souches retenues pour notre étude après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%,

Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, les souches isolées (S7, S34, S26, S37 et S23), B79 : *Oenococcus oeni* témoin + et (-) : sans ADN.

2 - Auxotrophies vis-à-vis de 4 acides aminés précurseurs d'amines biogènes des 5 souches retenues.

Nous avons testé l'auxotrophie des 5 souches en milieu MCD à pH 5,3 sur un minimum de trois répétitions. Nous avons retenu ce pH car c'est le pH optimum de culture de *O. oeni* et par ailleurs toutes les études faites sur les besoins en acides aminés pour *O. oeni* sont effectuées dans un zone de pH entre 4,8 et 5,3 qui permet une croissance significative des bactéries (Garvie, 1967 ; Fourcassie *et al.*, 1992 ; Saguir et Manca de Nadra, 2002 ; Remize *et al.*, 2006).

Pour l'interprétation des données, l'acide aminé omis du milieu : Arg, His, Tyr ou Phe sera dit :

- essentiel lorsque la biomasse formée sera inférieure à 25% de celle de la culture témoin (E)
- stimulant lorsque la biomasse formée correspondra à 25 - 80% de celle de la culture témoin (S)
- non essentiel lorsque la biomasse formée de la culture représentera plus de 80% de celle obtenue dans le témoin (NE).

Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 11. Les données sont exprimées en poucentage de valeurs A_{600nm} mesurée en phase stationnaire pour chaque souche sur celle obtenue dans le MCD contenant tous les acides aminés (culture témoin).

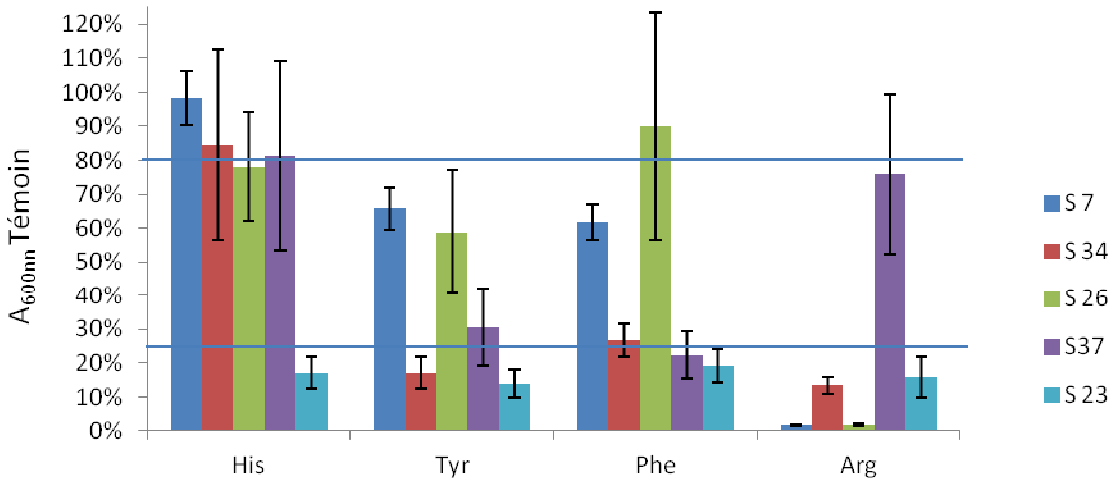


Fig. 11 - Croissance bactérienne des 5 souches en milieu MCD avec omission de l'acide aminé indiqué

Les deux lignes horizontales indiquent les limites entre les trois zones de classification : E, S et NE.
Les chiffres correspondent à la moyenne obtenue sur un minimum de 3 expérimentations indépendantes.

Comme pour Remize *et al.* (2006), pour certains acides aminés et pour certaines souches nous avons observé de larges variations de rendement de croissance lors de la répétition d'expériences d'omissions. Cet effet est visualisé sur les graphes par des écart-types importants : cas notamment de l'histidine pour les souches 34, 26 et 37, de la tyrosine pour la souche 26, de la phénylalanine pour la souche 26 et de l'arginine pour la souche 37. Du fait des faibles besoins quantitatifs en

azote de *Oenococcus oeni* (Guilloux-Benatier *et al*., 2006), une teneur résiduelle dans les cellules en acides aminés omis peut vraisemblablement suffire à assurer une croissance bactérienne. Ceci a déjà été observé par Remize *et al*. (2006). On ne peut pas en effet penser à la présence résiduelle dans le culot bactérien du milieu de préculture LAC, très riche en azote, puisque les cellules bactériennes ont subi plusieurs lavages successifs avec l'eau physiologique.

La souche S23 est la plus exigeante des 5 souches car les 4 acides aminés testés apparaissent essentiels pour sa croissance. Les autres souches présentent seulement une ou deux auxotrophies : vis-à-vis de l'arginine pour S7, S24 et S26, vis-à-vis de la tyrosine pour S34 et vis-à-vis de la phénylalanine pour S37. On peut cependant noter que l'omission d'un des 4 acides aminés choisis conduit le plus souvent à une biomasse plus faible que dans le milieu complet avec le plus souvent un effet très significatif.

La comparaison des auxotrophies vis-à-vis de ces 4 acides aminés chez *O. oeni* reportée dans la littérature et dans notre étude est donnée dans le tableau XV.

Tableau XV - Comparaison des auxotrophies déterminées chez *O. oeni* dans différentes études pour 4 acides aminés

Etude	Garvie (1967)	Fourcassie *et al.* (1992)	Saguir et Manca de Nadra (2002)	Remize *et al.* (2006)	Terrade et Mira de Orduna (2009)	cette étude
Nombre de souches testées	9	6	1	5	2	5
Histidine	E 6/9 S 3/9	E 1/6 S 0/6 NE 5/6	non testé	E 3/5 S 2/5	E 2/2	E 1/5 S 1/5 NE 3/5
Tyrosine	E 9/9	E 1/6 S 0/6 NE 5/6	E 1/1	E 5/5	E 2/2	E 2/5 S 3/5
Phénylalanine	E 7/9 S 2/9	E 1/6 S 0/6 NE 5/6	E 0/1 S 1/1	E 5/5	E 2/2	E 2/5 S 2/5 NE 1/5
Arginine	E 9/9	E 6/6	E 0/1 S 1/1	E 3/5 S 2/5	E 2/2	E 4/5 S 1/5

E : essentiel, S : stimulant, NE : non essentiel

Au vu de cette comparaison, plusieurs remarques peuvent être faites :

- l'arginine n'est jamais indifférent pour les souches de *O. oeni* testées : il est essentiel pour la majorité des souches (24 sur 28) ou stimulant (4 sur 28)

- la tyrosine dans toutes les études, excepté celle de Fourcassie *et al.* (1992), apparait aussi comme un acide aminé essentiel pour 19 souches et stimulant pour 3 souches

- l'histidine et la phénylalanine, lorsqu'ils sont absents du milieu, ont un effet très souche dépendante. L'acide aminé histidine apparaît essentiel pour 13 souches sur 27, stimulant pour 6 souches et non essentiel pour 8 souches. L'acide aminé phénylalanine apparaît essentiel pour 17 souches sur 27, stimulant pour 5 souches et non essentiel pour 6 souches.

Les auxotrophies vis-à-vis des acides aminés pour *Oenococcus oeni* doivent donc être vérifiées pour chaque souche bactérienne car ce travail confirme qu'elles sont très variables selon les souches d'une même espèce.

3 - Capacité des souches à produire des amines biogènes

Les 5 souches ont été cultivées en milieu MCD à pH 5,3 de manière à favoriser l'utilisation des acides aminés et donc la production éventuelle d'amines biogènes (Mira de Orduna *et al*., 2001 ; Arena et Manca de Nadra, 2001 ; Gardini *et al.*, 2005). En effet, l'utilisation de l'arginine ne serait pas possible à faible pH (< à 3,5) pour *Oenococcus oeni* (Liu et Pilone, 1998) même si après récolte en fin de phase de croissance des souches pré-cultivées dans un milieu à pH élevé et transplantées dans un tampon de faible pH (3,2) se sont avérées capables de produire de la putrescine à partir de l'arginine (Mangani *et al*., 2005).

En fin de phase exponentielle de croissance, les bactéries lactiques sont éliminées du milieu par centrifugation et les amines biogènes présentes dans le milieu sont dosées par RP-HPLC. Le tableau XVI rassemble les résultats obtenus pour les 5 souches de *O. oeni.*

Tableau XVI - Production d'amines biogènes par les 5 souches

Souches	Amines biogènes détectées ($mg.L^{-1}$)		
	AGM	PUT	PHM
7	120 ± 2,9	nd	nd
34	63,9 ± 0,8	nd	0,6 ± 0,1
26	81,5 ± 1,3	0,4 ± 0,04	nd
37	nd	nd	nd
23	90,4 ± 1,6	nd	nd

nd : non détecté AGM = agmatine. PUT = putrescine ; PHM = phényléthylamine

Bien que tous les acides aminés précurseurs d'amines biogènes soient présents dans le milieu (lysine pour cadavérine, tryptophane pour tryptamine…), seulement 3 amines ont été détectées et quantifiées. L'agmatine est l'amine la plus importante en quantité produite pour 4 des 5 souches testées avec des valeurs très élevées : de 64 $mg.L^{-1}$ pour la souche 34 à 120 $mg.L^{-1}$ pour la souche 7.

Excepté l'agmatine, les concentrations en amines biogènes dosées dans le milieu après croissance bactérienne sont très faibles. Ces résultats confirment différents travaux (Straub *et al.*, 1995 ; Moreno-Arribas *et al.*, 2003 ; Ruiz *et al.*, 2010) qui montrent que l'espèce *Oenococcus oeni* n'a pas beaucoup de potentialité à former des amines. Dans notre étude, il n'a ainsi jamais été détecté d'histamine ni de tyramine quelle que soit la souche testée, alors que ces amines sont souvent dosées dans les vins rouges après fermentation malolactique.

Malgré ces faibles concentrations produites par ces 5 souches, nous pouvons cependant tenter de voir s'il existe une relation entre l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé, la présence dans le génome de la bactérie du gène codant pour la synthèse de l'amine biogène correspondante et l'amine retrouvée dans le milieu (Tableau XVII).

Tableau XVII - Relation entre auxotrophies vis à vis d'acides aminés précurseurs, présence des gènes et production de l'AB correspondante par les 5 souches

Souches	Auxotrophie pour	Présence des gènes	Amines dosées		
			AGM	PUT	PHM
7	Arg	*hdc, tyrdc, odc, arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*	+++	nd	nd
34	Arg, Tyr	*tyrdc, odc, arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*	+++	nd	+
26	Arg	*tyrdc, hdc, odc, arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*	+++	+	nd
37	Phe	*odc, arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*	nd	nd	nd
23	Arg, Tyr, Phe, His	*tyrdc, odc, arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*	+++	nd	nd

+ : [AB] inférieure à 1mg.L^{-1}, +++ : [AB] supérieure à 10 mg.L^{-1}, nd : non détecté

AGM = agmatine. PUT = putrescine ; PHM = phényléthylamine

Les souches 7 et 26 sont *hdc*$^{+}$, cependant, on ne retrouve pas d'histamine dans le milieu après croissance de ces 2 souches. Par contre, l'absence d'histamine dans le milieu pour les souches 23, 34 et 37 s'explique par l'absence du gène *hdc* dans ces souches. Comme le montrent nos résultats, la présence dans le génome bactérien du gène codant pour l'histidine décarboxylase ne signifie pas nécessairement que la souche produira de l'histamine. Ainsi l'utilisation des sondes

moléculaires comme cela est reporté dans la littérature (Coton *et al.* ; 1998 ; Lonvaud-Funel , 2001 ; Landete et al, 2005) pour détecter des souches porteuses de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse d'amines ne permet pas de conclure sur une production effective d'amines. Il apparait en effet impossible de prédire une production d'amines biogènes dans un milieu donné même si des populations porteuses de gènes codant pour des décarboxylases sont présentes (Nannelli *et al*., 2005). Landete *et al*. (2005) observent évidemment une corrélation de 100% entre la production d'histamine et la présence du gène *hdc* chez les différentes souches testées mais avec des teneurs synthétisées par *Oenococcus oeni* qui s'avèrent le plus souvent très faibles. Ces faibles concentrations dosées dans les milieux de culture sont aussi trouvées par Rosi *et al.* (2009) qui en concluent que cette espèce a peu d'affinité pour former des amines. Leitao *et al.* (2000) arrivent également à cette conclusion. Le lien entre auxotrophie vis-à-vis de l'histidine et production d'histamine est difficile à établir puisque la seule souche auxotrophe pour l'histidine, la souche 23, ne possède pas le gène *hdc* et les 2 souches qui ont le gène *hdc* ne sont pas auxotrophes pour cet acide aminé et ne produisent pas d'histamine.

Les souches 7, 34, 26 et 23 possèdent le gène *tyrdc* mais ici aussi aucune production de tyramine dans le milieu n'est trouvée. Les souches auxotrophes pour la tyrosine : souches 23 et 34 et possédant le gène *tyr* ne produisent pas plus de tyramine que les 2 souches non auxotrophes pour cet acide aminé et qui elles aussi sont *tyr+*.

Parmi ces 4 souches, seule la souche 34 produit une très faible quantité de phényléthylamine (0.6 mg/l). Il semble bien que O*enococcus oeni* ne soit pas un producteur de phényléthylamine et de tyramine. Guerrini *et al.* (2002) ne trouvent pas eux aussi de quantités significatives de ces 2 amines dans un milieu de culture ensemencé avec 44 souches différentes de *Oenococcus oeni*. Une production simultanée de tyramine et de phényléthylamine par les bactéries lactiques telles que *L. brevis* et *L. hligardii* a été observée mais ces espèces sont souvent de forts producteurs. Lorsque les souches sont faiblement productrices de tyramine, il n'y a pas de synthèse dans le milieu de phényléthylamine (Moreno-Arribas *et al*., 2000).

Bien que toutes les souches possèdent le cluster *arc* en entier et soient *odc+*, donc potentiellement capables de produire de la putrescine via l'ornithine, cette amine n'est seulement formée que par la souche 26 et à un très petit niveau (0,4 $mg.L^{-1}$). 4 souches sur 5 produisent de grandes quantités

d'agmatine entre 60 et 120 mg.L^{-1}. Quelques souches de *Lactobacillus hilgardii* ont été vues pour être des producteurs d'agmatine (Arena et Manca de Nadra, 2001) mais aussi des producteurs de putrescine à partir de l'agmatine (Alberto *et al*, 2007). A notre connaissance, nous décrivons pour la première fois une forte production d'agmatine chez des souches de *Oenococcus oeni*. Peu d'études donnent les teneurs en agmatine dans les vins (Tableaux V, VI et VII) mais des concentrations de l'ordre de 20 mg.L^{-1} ont été signalées dans des vins rouges (Bauza *et al.*, 1995a ; Anli *et al*., 2004). Il faudra donc maintenant s'attacher à quantifier cette amine dans les vins car *O. oeni* qui est très souvent l'agent de la fermentation malolactique pourrait être responsable de teneurs élevées en cette amine. Néanmoins nos souches ne pourront pas former de la putrescine par la voie de l'agmatine déiminase puisqu'elles sont toutes *agdi-*.

En ce qui concerne le lien en auxoptrophie vis-à-vis de l'arginine et production, les 4 souches auxotrophes vis-à-vis de cet acide aminé (7, 34, 26 et 23) ne synthétisent pas plus de putrescine que la souche 37 non auxotrophe. L'existence du gène *odc* et du cluster *arc* impliqués dans la synthèse de la putrescine dans toutes les souches ne conduit donc pas nécessairement à la production de la putrescine. Dans le vin, l'apparition de putrescine par *O. oeni* peut se faire aussi par association métabiotique avec des souches qui contiennent seulement la voie arginine déiminase (production de ornithine à partir d'arginine) et d'autres souches qui ne peuvent dégrader l'arginine en ornithine mais qui sont capables par contre de décarboxyler l'ornithine ainsi produite pour former de la putrescine (Mangani *et al.*, 2005). Les souches que nous avons isolées ont, elles, simultanément dans leur génome le cluster *arc* de la voie ADI et le gène *odc* ce qui indique qu'elles contiennent le système enzymatique complet leur permettant potentiellement à partir de l'arginine de synthétiser de l'ornithine puis ensuite de la putrescine. Les 4 souches auxotrophes pour l'arginine ne produisent pas plus de putrescine dans le milieu que la souche non auxotrophe vis-à-vis de cet acide aminé. Par contre ces 4 souches semblent synthétiser de plus grandes quantités d'agmatine que la souche non auxotrophe. Cependant ceci ne sera pas observé dans d'autres milieux (vin et et milieu MCD à plus faible pH) (cf partie II de Résultats et discussion).

En conclusion, il n'existe pas de relation claire entre auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé et production de l'amine biogène correspondant. La présence dans le milieu de l'acide aminé dont la bactérie est auxotrophe n'induit pas du tout de synthèse accrue de l'amine biogène correspondant.

Ces résultats sont intéressants car les souches de bactéries lactiques de l'espèce *Oenococcus oeni* présentent très souvent de nombreuses auxotrophies vis-à-vis des acides aminés. Il faut cependant rester prudent avec cette affirmation d'absence de relation entre auxotrophie et production d'amine car les souches bactériennes utilisées au cours de ce travail n'ont probablement pas le même fond génétique. Ce travail devra être repris lorsque des outils adaptés à la manipulation génétique de *Oenococcus oeni* seront disponibles (Assad Garcia *et al*., 2008).

Par ailleurs, il n'a pas été retrouvé dans le génome des souches de *Oenococcus oeni* séquencées (GenBank) de gène codant pour une protéine présentant de forte identité avec l'arginine décarboxylase trouvée chez *Lactobacillus casei* (Zhang *et al.*, 2010). Cette recherche a été réalisée à l'aide du programme BlastP sur le serveur NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Les 4 souches indigènes de *O. oeni* isolées au cours de ce travail (souches 7, 34, 26 et 23) sont cependant capables de décarboxyler l'arginine puisqu'il est retrouvé dans le milieu après leur croissance de l'agmatine.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'ornithine décarboxylase pourrait présenter une activité décarboxylase vis-à-vis d'autres acides aminés dont l'arginine. Différentes études montrent en effet des décarboxylases spécifiques d'acide aminé capables de décarboxyler d'autres substrats ; ceci est le cas pour l'arginine décarboxylase de *Cucumis sativus* qui décarboxyle l'arginine et l'ornithine (Prasad et Adiga, 1986), et pour l'ornithine décarboxylase de *Vibrio vulnificus* et de *Staphylococcus epidermidis* qui décarboxyle l'ornithine et la lysine (Lee *et al*., 2007 ; Coton *et al*., 2010b). En ce qui concerne les bactéries lactiques, les ornithines décarboxylases de *Lactobacillus sp.* 30a (Guirard et Snell, 1980) et de *Oenococcus oeni* BR14/97 ont été caractérisées au niveau enzymatique (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2011). Ces 2 enzymes présentent une très forte spécificité pour l'ornithine même si l'ODC de *Lactobacillus* sp. 30a a une très faible activité de décarboxylation vis-à-vis de la lysine et de l'acide 2,4-diaminobutyrique (ADAB). Très récemment Romano *et al.* (2012) caractérisent les ODC de plusieurs bactéries lactiques et montrent qu'il existe en fait deux voies de décarboxylation de l'ornithine chez ces microorganismes. L'une de ces voies implique l'ODC qui présente alors une très forte spécificité pour l'ornithine avec une faible activité sur la lysine (cas de *O. oeni* IOEB 89006 et *L. brevis* IOEB 9906) et l'autre voie utilise une décarboxylase très active sur l'ADAB avec une activité beaucoup plus faible pour l'ornithine (cas de *L. gasseri* ATCC 33323 et *L. casei* ATCC 334).

Par contre dans toutes ces études, aucune activité de décarboxylation vis-à-vis de l'arginine n'a été détectée. Il semble donc probable que la voie de décarboxylation de l'arginine que nous avons

trouvé dans les 4 isolats implique une autre décarboxylase. Cette protéine pourrait être codée par un gène pouvant être porté par un plasmide. Cette voie métabolique pour ces 4 souches pourrait avoir été acquise par un transfert horizontal et correspondre alors à une adaptation de ces souches à une niche écologique particulière.

II - Effet du stress acide sur la production des amines biogènes par les souches de *O. oeni*

Pour cette étude, nous avons choisi de quantifier la production d'amines après la croissance bactérienne dans deux milieux de culture qui diffèrent (i) par la présence ou l'absence de l'acide malique (respectivement vin et MCD) qui permet lors de la fermentation malolactique une meilleure résistance à l'acidité (maintien du pH intracellulaire) et (ii) par le niveau de l'acidité : pH 5,3 et 4 pour le milieu MCD et pH 4,5 et 3,5 pour le vin. Les valeurs de pH ont été choisies relativement élevées pour permettre aux bactéries d'utiliser les acides aminés et ainsi éventuellement de produire des amines (Mira de Orduna *et al.*, 2001 ; Gardini *et al.*, 2005). Car certains auteurs montrent en effet que l'utilisation de l'arginine par exemple ne serait pas possible pour des pH inférieurs à 3,2 ou 3,5 (Liu *et al.*, 1995 ; Terrade et Mira de Orduna, 2006) même si cela apparait plus souche dépendante que caractéristique de l'espèce (Mangani *et al.*, 2005).

Les souches bactériennes testées sont les 5 souches indigènes de *O. oeni* que nous avons isolées (7, 34, 26, 37 et 23) ainsi qu'une souche de *O. oeni* notée B79 productrice de la putrescine (Bonnin Jusserand *et al.*, 2011). Cette dernière a été rajoutée car les 5 souches isolées sont peu productrices d'amines excepté l'agmatine (§ 1 du chapitre 3).

1. Production d'amines après croissance bactérienne en fonction de l'acidité de milieu

La figure 12 donne les biomasses maximales formées par les souches bactériennes dans les différents milieux estimées par la mesure de l'absorbance à 600 nm.

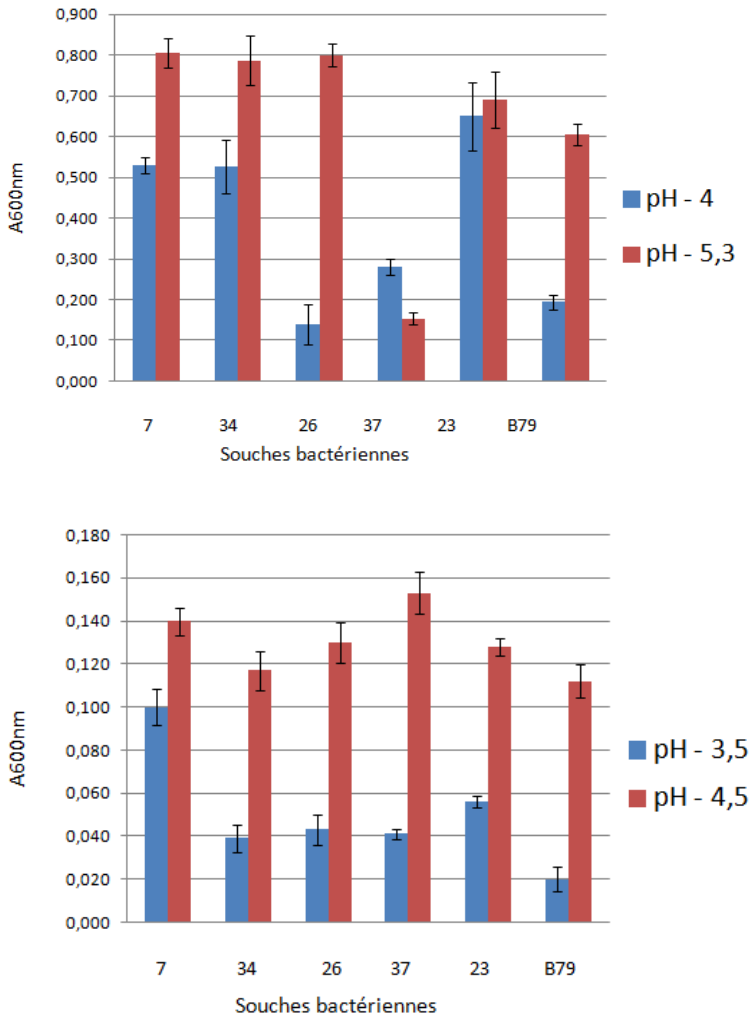


Fig. 12 - Biomasses formées dans le milieu MCD (a) et le milieu vin (b) des 6 souches de *O. oeni* en fin de phase exponentielle de croissance.

Comme décrit par Terrade *et al.* (2009), le milieu MCD permet une forte production de biomasse de *O. oeni* largement supérieure à celle qui est mesurée dans le vin et ce pour les deux pH considérés (+ ou – bas). La souche 37 produit la biomasse la plus faible que ce soit à pH 5,3 ou 4,0. Alors que toutes les autres souches se développent mieux lorsque l'acidité du milieu est plus faible, cette souche forme pratiquement deux fois plus de biomasse dans le milieu plus acide. A pH 4,0, on note des différences importantes selon les souches : une absorbance $A_{600\ nm}$ supérieure à 0,5 pour 7, 34 et 23 et inférieure à 0,3 pour 26, 37 et B79.

Dans le milieu vin, les croissances de toutes les souches sont beaucoup plus faibles que dans le milieu MCD. A pH 4,5, elles sont comprises entre 0,112 pour la souche B79 et 0,153 pour la souche 37. En milieu plus acide (pH 3,5), les différences sont plus marquées et seule la souche 7 atteint une absorbance de 0,1. Pour toutes les autres souches les absorbances mesurées en fin de

croissance sont inférieures à 0,06 et la souche B79 a la plus petite biomasse formée (A_{600nm} = 0,020).

Les concentrations en amines biogènes que nous avons pu détecter et doser dans les milieux en fin de croissance exponentielle des bactéries sont données dans le tableau XVIII pour le milieu MCD et dans le tableau XIX pour le vin. Pour le vin, la production en amines a été calculée par différence entre la concentration dosée après croissance bactérienne et la concentration du vin avant l'ensemencement bactérien.

Tableau XVIII - Production d'amines biogènes par les souches de *O. oeni* en milieu MCD.

Souches		Production d'amines biogènes ($mg.L^{-1}$)			
	pH	Agmatine	Putrescine	Spermine	Phényléthylamine
7	5,3	120 ± 2,9	ND	ND	ND
	4	27 ± 0,2	ND	ND	ND
34	5,3	63,9 ± 0,8	ND	ND	0,6 ± 0,1
	4	20,1 ± 0,1	ND	ND	0,3 ± 0,1
26	5,3	81,5 ± 1,3	0,4 ± 0,1	ND	ND
	4	3,4 ± 0,1	ND	ND	ND
37	5,3	ND	ND	ND	ND
	4	0,7 ± 0,1	ND	ND	ND
23	5,3	90,4 ± 1,6	ND	ND	ND
	4	0,1± 0,1	ND	ND	ND
B79	5,3	ND	ND	ND	ND
	4	ND	ND	ND	ND

ND : non détecté

Tableau XIX - Production d'amines biogènes par les souches de *O. oeni* en milieu vin.

Souches	pH	Producion d'amines biogènes ($mg.L^{-1}$)			
		Agmatine	Putrescine	Spermine	Phényléthylamine
7	4,5	32,3 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	3,5	14,9 ± 0,1	ND	ND	ND
34	4,5	26,8 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	3,5	2,9 ± 0,1	ND	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
26	4,5	20,3 ± 0,2	ND	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	3,5	3,9 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
37	4,5	23,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	3,5	4,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
23	4,5	29,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	3,5	4,2 ± 0,1	ND	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
B79	4,5	ND	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	3,5	ND	0,6 ± 0,1	ND	ND

ND : non détecté

Très peu d'amines biogènes différentes ont été synthétisées dans les différents milieux de culture puisque seulement l'agmatine, la putrescine, la phényléthylamine et la spermine ont été dosées. Dans le milieu MCD, toutes les souches synthétisent de l'agmatine excepté la souche B79. Seule la souche 34 produit en plus de la phényléthylamine en très faible concentration (0,6 ou 0,3 $mg.L^{-1}$) et la souche 26 de la putrescine, la teneur dosée est inférieure à 0,4 $mg.L^{-1}$. La souche B79 ne produit apparemment aucune amine dans ce milieu. Dans le milieu vin, on retrouve l'agmatine, la putrescine, la phényléthylamine mais aussi la spermine. De plus même si les concentrations sont très faibles (< $1mg.L^{-1}$), toutes les souches synthétisent de la phényléthylamine, de la putrescine et de la spermine. Dans ce milieu, la souche B79 ne produit pas non plus d'agmatine. Les 2 milieux de culture contiennent tous les acides aminés précurseurs des amines tels que l'histidine, la tyrosine, le tryptophane... mais ni l'histamine, la tyramine et la tryptamine ne sont détectées dans les milieux de culture après croissance bactérienne. Ces résultats confirment que l'espèce *O. oeni* n'est pas une espèce très productrice au contraire d'autres bactéries du genre *Lactobaccillus* (Arena et Manca de Nadra, 2001). Ceci peut sans doute être mis en relation avec les faibles consommations d'azote constatées chez *O. oeni* (Remize *et al.,* 2006 ; Guilloux-Benatier *et al.,* 2006) lors de son développement.

Le fait que de l'agmatine soit retrouvée dans le milieu synthétique MCD contredit les conclusions de Del Prete *et al.* (2009). Ces auteurs rapportent en effet que ni *O. oeni* ni *S. cerevisiae* ne sont capables de produire de l'agmatine dans le vin et que l'agmatine retrouvée dans le vin provient en fait de l'hydrolyse enzymatique microbienne des complexes agmatine–acides hydroxycinnamiques qui existent naturellement dans le raisin et qui se retrouvent alors dans le moût de raisin. Or en l'absence de ces complexes dans le milieu MCD, la présence d'agmatine est bien due à la décarboxylation de l'arginine par les différentes souches de *O. oeni* étudiées. Dans le vin, la présence d'agmatine pourra sans aucun doute être due en partie à l'activité arginine décarboxylase de *O. oeni*.

La comparaison des teneurs retrouvées dans les différents milieux posent les questions suivantes :

- existe-t-il un lien entre la richesse en précurseurs du milieu et la quantité d'amines produites ?
- existe-t-il un lien entre le niveau de population et la quantité d'amines produites ?
- existe-t-il un lien entre l'acidité du milieu et la production d'amines produites ?

Nous avons ici 2 milieux de culture très différents en composition et teneur en azote : acides aminés libres à raison de 1022,3 mg $N.L^{-1}$ par le milieu MCD, acides aminés libres à raison de 127,6 mg $N.L^{-1}$ et acides aminés liés (peptides et/ou protéines) à raison de 71,4 mg $N.L^{-1}$ pour le milieu vin. La disponibilité en arginine et phénylalamine (précurseurs des amines dosées dans les milieux de culture) est notée dans le tableau XX.

Tableau XX - Disponibilité en précurseurs arginine et phénylalanine dans les 2 milieux

Forme d'azote	Arginine ($mg.L^{-1}$)		Phénylalanine ($mg.L^{-1}$)	
	MCD	Vin	MCD	Vin
acides aminés	750	23,8	200	11,2
peptides et /ou protéines	-	18,2	-	16,1

Même si à première vue, les concentrations en amines apparaissent plus élevées dans le milieu MCD que dans le vin, une analyse plus précise montre que les résultats que nous avons obtenus ne vont pas dans le sens d'un lien clair entre disponibilité en précurseurs et production. En effet :

- la souche 37 produit 23,3 mg.L^{-1} d'agmatine dans le milieu vin à pH 4,5 et 0 mg.L^{-1} de cette amine dans le milieu MCD à pH 5,3 et seulement 0,7 mg.L^{-1} dans le milieu MCD à pH 4 ;
- la souche B79 ne produit pas de putrescine en milieu MCD alors qu'elle en produit 0,6 où 0,9 mg.L^{-1} dans le vin beaucoup moins riche en arginine ;
- la souche 26 produit des quantités voisines d'agmatine dans le milieu MCD pH 4 et le vin pH 3,5 (respectivement 3,4 et 3,9 mg.L^{-1})
- la souche 34 produit la même quantité de phényléthylamine (0,3 mg.L^{-1}) dans le milieu MCD à pH 4 et dans le milieu vin à pH 3,5 alors que le milieu MCD contient 7,3 fois plus de substrat précurseur que le vin.

Les résultats que nous obtenons montrent que la disponibilité en précurseurs n'est donc pas liée à une plus forte synthèse des amines correspondantes. Dans la littérature, les résultats sont contradictoires: certains auteurs trouvent une forte relation entre concentration initiale du milieu en précurseurs et amines correspondantes (Herbert *et al*., 2005 ; Hernandez-Orte *et al*., 2008 ; Marcobal *et al*., 2006 ; Moreno-Arribas et Polo, 2008 ; Arena *et al*., 2011) alors que d'autres ne voient aucune corrélation (Bauza *et al*., 1995b).

Cette non relation trouvée dans cette étude peut vraisemblablement être mise en relation (i) avec des demandes en azote variables selon les souches et (ii) avec la source d'azote du milieu. En effet, il a été montré que chez *O. oeni* la fraction peptidique est une source d'azote beaucoup intéressante pour sa croissance que les acides aminés libres (Guilloux-Benatier et Chassagne, 2003; Remize *et al.*, 2006 ; Aredes Fernández *et al*., 2010). La seule considération de la disponibilité en précurseurs du milieu ne peut donc en aucun cas être suffisante pour prédire la production d'amines possibles par les bactéries lactiques présentes dans le milieu.

Qu'en est-il d'un lien entre population et production ?

Dans le milieu MCD faiblement acide (pH 5,3), les concentrations en agmatine (seule amine majoritairement retrouvée pour les cultures des 5 souches isolées) produite et dosée en fin de croissance ne sont pas en lien direct avec la population bactérienne formée. Ainsi les cultures des souches 7, 34 et 26 présentent des valeurs d'absorbance à 600 nm très proches (environ 0,8) mais des teneurs en agmatine très différentes : la souche 7 en produit 2 fois plus que la souche 34 et 1,5 fois plus que la souche 26. Dans le même milieu à pH 4, la souche 23 qui a donné une culture

avec une absorbance finale de 0,65 ne produit pratiquement pas d'agmatine (0,1 mg.L^{-1}) alors que la souche 34 qui dépasse légèrement 0,5 en absorbance en produit 20,1 mg.L^{-1}. Dans ce milieu MCD, on n'observe donc aucun lien entre niveau de population bactérienne et teneur en amines produites.

Dans le vin, la même constatation peut être faite. A pH 4,5, nous avons une quantité d'agmatine produite pratiquement équivalente pour les souches 34 et 37 (respectivement 26,8 et 23,3 mg.L^{-1}) alors que les populations formées sont 24% plus élevées pour la souche 37. La souche 26 forme autant de biomasse que la souche 23 (respectivement 0,130 et 0,128) mais produit 31% de moins d'agmatine. C'est seulement dans le vin à pH 3,5 qu'on peut trouver une relation entre population et quantité produite mais ceci que pour l'agmatine. La souche 7 qui forme le plus de biomasse synthétise effectivement le plus d'agmatine ; par contre ceci n'est plus vrai pour les autres amines dosées dans le milieu (putrescine, spermine et phényléthylamine). La teneur la plus élevée en agmatine est retrouvée pour la souche 7 qui donne effectivement la biomasse la plus élevée.

La seule considération du niveau de population bactérienne dans un milieu ne peut donc en aucun cas être suffisante pour prédire une quantité d'amines pouvant être synthétisées par ces bactéries.

Qu'en est-il d'un lien entre niveau d'acidité du milieu et production d'amines ?

L'augmentation de l'acidité du milieu MCD (de pH 5,3 à pH 4) se traduit par une nette diminution de la concentration de l'amine majoritaire du milieu (agmatine), de l'ordre de 78% pour la souche 7, de 69% pour la souche 34, de 96% pour la souche 26 et plus de 99% pour la souche 23. Les variations obtenues pour la phényléthylamine et la putrescine vont dans le même sens même si les concentrations dosées sont très faibles. Quant à la souche 37 qui se développe mieux à pH 4 qu'à pH 5,3, les concentrations obtenues en agmatine apparaissent très faibles (< 1 mg.L^{-1}) dans les deux milieux.

Dans le vin, la concentration en agmatine diminue aussi beaucoup lorsque l'acidité du milieu augmente (pH 4,5 à pH 3,5) et ce pour toutes les souches. On note des diminutions de 54% pour la souche 7, et supérieures à 80% pour les souches 34, 26, 37 et 23 (respectivement 89, 81, 82 et 86%). Le même résultat est obtenu pour la putrescine même si les teneurs dosées restent très faibles. Quant aux autres amines, l'interprétation reste délicate compte tenu des quantités détectées.

La production d'amines par les bactéries lactiques est souvent invoquée dans la résistance au stress acide (Molenaar *et al.*, 1993 ; Wolken *et al.*, 2006). Nos résultats ne vont pas dans ce sens et sont en accord avec ceux de Marques *et al.* (2007) qui trouvent aussi des teneurs produites par exemple en putrescine chez *O. oeni* plus faibles lorsque le pH baisse, et avec ceux de Landete *et al.* (2005b) qui trouvent également une plus forte production d'histamine dans le vin en lien direct avec des pH élevés (> à 3,6).

Compte tenu des niveaux de populations très différents mesurés dans les 4 milieux de culture, et afin de mieux voir l'impact de l'acidité sur la synthèse de l'agmatine notamment (car amine majoritaire), nous avons calculé la capacité propre à chaque souche de produire de l'agmatine ; elle est exprimée en quantité produite en µmol.L^{-1} pour 0,1 unité d'absorbance à 600 nm (Fig. 13).

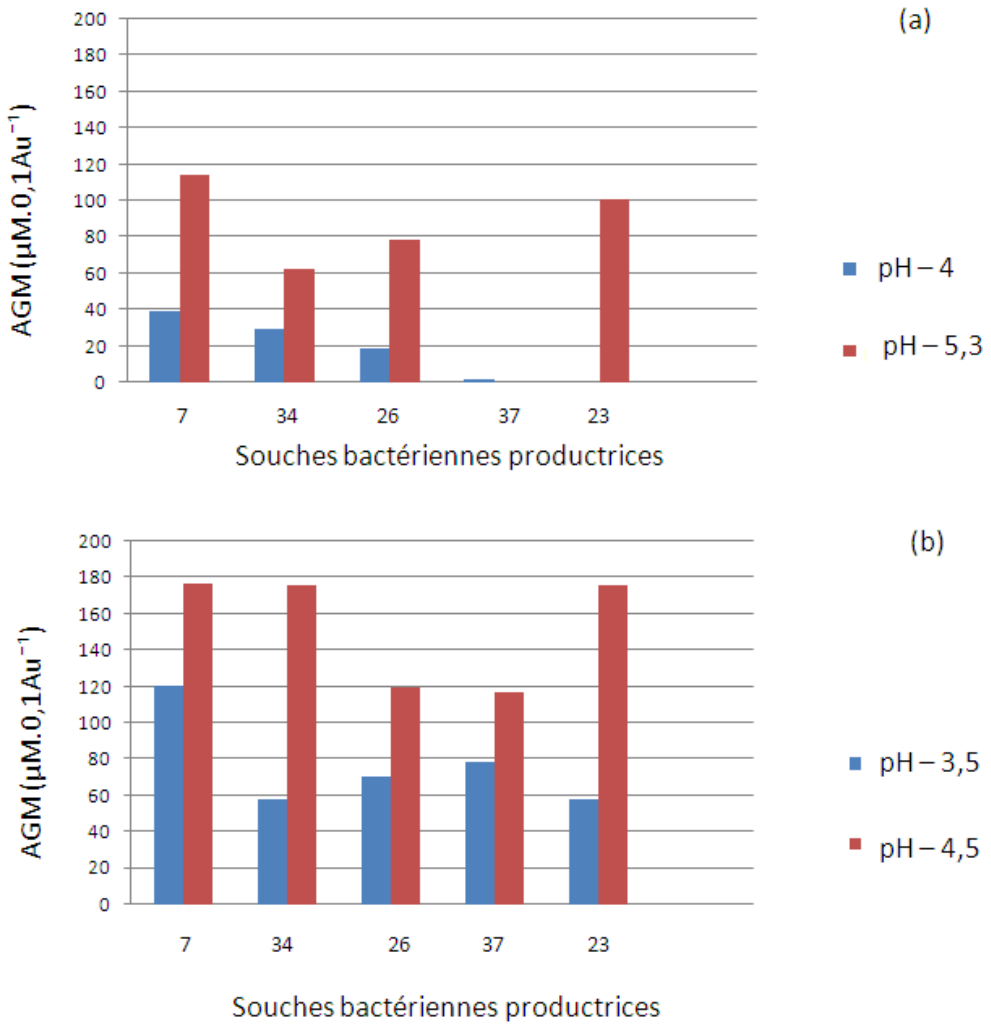


Fig. 13 - Capacité spécifique des souches à produire de l'agmatine (AGM) dans le milieu MCD (a) et dans le vin (b).

Cette capacité propre est différente selon les souches bactériennes et apparaît très influencée par le milieu de culture. Elle est, pour toutes les souches et pour les 2 pH considérés, supérieure dans le milieu vin. Cette augmentation de production pour une même quantité de biomasse pourrait s'expliquer par les conditions plus stressantes trouvées dans le vin (moins d'éléments nutritifs, présence de composés inhibiteurs tels l'éthanol et le dioxyde de soufre notamment) pour les bactéries et conforterait ainsi l'idée, très répandue dans la littérature, que la production d'amines par les bactéries est un moyen mis en place par les bactéries pour lutter contre un milieu stressant. En effet, sur un milieu appauvri nutritionnellement, les bactéries trouvent alors un moyen supplémentaire de générer de l'énergie métabolique sous forme d'ATP par l'utilisation de certains acides aminés (Konings *et al*., 1997). Ceci explique pourquoi on trouve par exemple plus de putrescine dans le milieu vin que dans le milieu MCD.

La présence de spermine en milieu vin et non en milieu MCD pour les 5 souches, même si les concentrations dosées sont faibles (< à 1 $mg.L^{-1}$), peut s'expliquer par sa fonction antioxydative. Gardini *et al.* (2005) expliquent ainsi des productions plus fortes de spermine et spermidine lorsque les conditions de culture sont difficiles.

Néanmoins, la capacité spécifique de synthèse de l'agmatine (Fig. 13) diminue très nettement pour les 5 souches considérées avec l'augmentation de l'acidité du milieu et ce quel que soit le milieu considéré. Or la perte d'une fonction acide lors de la décarboxylation de l'arginine en agmatine a forcément un impact positif sur l'augmentation du pH. Le fait que la capacité spécifique à produire l'agmatine soit plus faible pour les 5 souches considérées dans le milieu le plus acide indique clairement que cette synthèse d'agmatine intervient très peu dans les mécanismes de régulation du pH mis en place par les bactéries. Ceci a déjà été vu chez *L. sakei* par Rimaux *et al.* (2012) pour la conversion de la citrulline en ornithine (voie ADI) qui est pH-dépendante et maximale au pH optimum de croissance.

D'un point de vue œnologique, ce résultat est intéressant car il montre bien que l'espèce *O. oeni*, le plus souvent responsable de la fermentation malolactique dans les vins, génère de faibles teneurs en amines et ce d'autant plus que le milieu est acide. Le maintien d'une certaine acidité du vin est un point important pour les vinificateurs car cela peut leur garantir des produits contenant finalement peu d'amines.

2. Production d'amines au cours de la survie bactérienne en milieu acide

Trois souches (7, 34 et B79) on été ensemencées à 10^8 UFC.mL^{-1} dans le milieu vin à pH 3,5.

Le nombre d'unités formant colonies est suivi sur 7 jours par numération sur milieu LAC en boite de Pétri (Fig. 14).

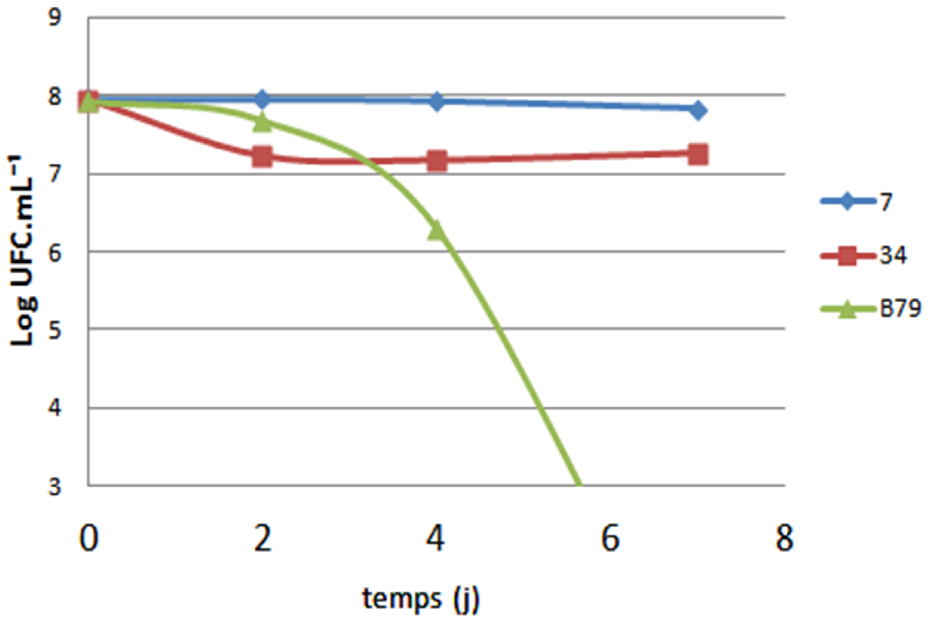


Fig. 14 - Viabilité cellulaire au cours du temps dans le vin à pH 3,5.

La souche 7 maintient son niveau de population autour de 10^8 UFC.mL^{-1} sur les 7 jours. La souche 34 voit sa population diminuer d'un facteur 10 pendant les 2 premiers jours puis se maintenir ensuite autour de 10^7 UFC.mL^{-1}. La souche B79 ne se maintient pas du tout et sa population décroit très rapidement, elle est inférieure à 10^4 UFC.mL^{-1} après 6 jours. Cette souche a une faible résistance au milieu acide.

Après 7 jours, le dosage des amines éventuellement produites par les 3 souches (7, 34 et B79) après 7 jours de survie dans le milieu vin à pH 3,5 a été réalisé par RP-HPLC. Les concentrations obtenues sont données dans le tableau XXI.

Tableau XXI – Amines produites par les souches 7, 34 et B79
après 7 jours de survie dans le vin à pH 3,5.

Souches	Production d'amines ($mg.L^{-1}$)			
	Agmatine	Phényléthylamine	Putrescine	Spermine
7	11,3 ± 0,1	0	0	0,15 ± 0,1
34	2,9 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,25 ± 0,1	0,6 ± 0,1
B79	0	0	0,2 ± 0,1	0,75 ± 0,1

La teneur la plus élevée en agmatine est retrouvée pour la souche 7, souche qui se maintient le plus longtemps vivante dans le milieu vin. Cette synthèse permet d'atténuer l'acidité du milieu par perte d'une fonction acide de l'arginine et permet peut-être alors à la souche de rester viable plus longtemps. De plus, le transport arginine/agmatine génère, comme d'autres transports (Lolkema *et al.*, 1996), une force proton-motrice constituée à la fois du potentiel membranaire et du gradient de pH créé par la décarboxylation intracellulaire qui consomme un proton et conduit à une alcalinisation du cytoplasme bactérien.

Mais même avec une diminution des populations vivantes, on observe aussi une production d'amines : agmatine, phényléthylamine, putrescine et spermine pour la souche 34 et putrescine et spermine pour la souche B79. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature puisqu'il a déjà été observé des augmentations de concentrations en amines sans aucune bactérie viable (Rosi *et al.*, 2009) et qui peuvent être dues seulement à un maintien des activités enzymatiques (Coton *et al.*, 1998). En conditions œnologiques, même si une souche produit peu d'amines pendant la FML, il existera donc toujours un risque potentiel car en survie ou en déclin certaines souches peuvent continuer à synthétiser des amines dans le milieu.

En conclusion, ce travail montre qu'il n'existe pas de relation nette entre la richesse en acides aminés précurseurs et la quantité d'amines correspondantes produites d'une part et le niveau de population bactérienne et la teneur en amines du milieu après croissance d'autre part. Par ailleurs, l'augmentation de l'acidité du milieu de culture ne se traduit pas pour les souches de *O. oeni* étudiées par une production plus élevée d'amines. Ceci signifie que la production d'amines souvent invoquée pour aider les cellules bactériennes à se développer et à survivre en conditions acides n'est vraisemblablement pas le mécanisme prépondérant.

III – Activités enzymatiques liées au métabolisme de l'arginine

L'amine majoritaire formée par les souches de *O. oeni* que nous avons retrouvée dans le milieu est l'agmatine. Aussi, nous avons décidé de regarder plus précisément le métabolisme de l'arginine chez *O. oeni*.

La dégradation de l'arginine est possible chez les bactéries hétérofermentaires du vin : elle se fait par la voie de l'arginine déiminase qui conduit à la formation d'ornithine, de CO_2, de NH_3 et d'ATP (Liu *et al*., 1996) avec une excrétion partielle de citrulline (Liu *et al*., 1994 ; Mira de Orduna *et al*., 2000) mais aussi par la voie de l'agmatine déiminase après décarboxylation de l'arginine en agmatine (Arena et Manca de Nadra, 2001 ; Alberto *et al.*, 2007). La putrescine provient alors soit de l'ornithine soit de l'agmatine (Fig. 3). Les trois souches retenues sont les souches 7, 34 et B79 qui montrent de grandes différences dans leur production en agmatine (Tableaux XIX et XX).

1- **Comparaison de la capacité des souches à dégrader l'arginine**

Après récolte des bactéries en fin de phase exponentielle de croissance dans le milieu LAC, les cellules et les extraits cellulaires correspondants ont été mis dans le tampon citrate-phosphate pH 5,3 additionné de pyridoxal-5'-phosphate et d'arginine à 3,6 mM. Après 3 heures de réaction, l'arginine et les métabolites apparus ont été dosés par RP-HPLC. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXII.

Tableau XXII - Consommation d'arginine et production de métabolites par les souches de *O. oeni* (7, 34 et B79).

	Souches	Arginine consommée ($\mu M.h^{-1}$)	Métabolites formés ($\mu M.h^{-1}$)			
			AGM	Orn	Cit	Put
Cellules entières	7	1468 ± 6	1563 ± 7	1745 ± 8	32 ± 1	ND
	34	202 ± 1	226 ± 1	86 ± 1	31 ± 1	ND
	B79	588 ± 2	ND	5,3 ±1	18 ± 1	ND
Extraits cellulaires	7	1158 ± 5	620 ± 3	527 ± 1	4 ± 1	ND
	34	203,2 ± 1	134 ± 1	67 ± 1	1 ± 1	ND
	B79	5 ±1	ND	3,5 ± 1	2 ± 1	ND

AGM (agmatine), Orn (ornithine), Cit (citrulline), Put (putrescine) ND= non détecté

Les 3 souches produisent de l'ornithine et de la citrulline à partir de l'arginine. Seules les souches 7 et 34 produisent en plus de l'agmatine. Aucune production de putrescine n'est détectée chez les 3 souches alors qu'elles ont toutes le gène *odc* codant pour l'ornithine décarboxylase. Sur cellules entières ou sur les extraits cellulaires, les 3 souches montrent des capacités d'utilisation de l'arginine différentes : la souche 7 consomme beaucoup plus de cet acide aminé que les souches 34 et surtout B79. Cette aptitude à dégrader l'arginine dépend de la souche, cette particularité phénotypique a déjà été mise en évidence par d'autres auteurs (Tonon *et al.*, 2001).

La répartition des métabolites produits est aussi différente pour les 3 souches : la souche 7 produit des quantités sensiblement équivalentes d'agmatine et d'ornithine, la souche 34 produit plus d'agmatine que d'ornithine et la souche B79 ne produit que faiblement de l'ornithine. Dans tous les cas, il est retrouvé de la citrulline, intermédiaire dans la voie ADI (arginine → citrulline → ornithine).

Les voies métaboliques utilisées par ces 3 souches est schématisée sur la figure 15.

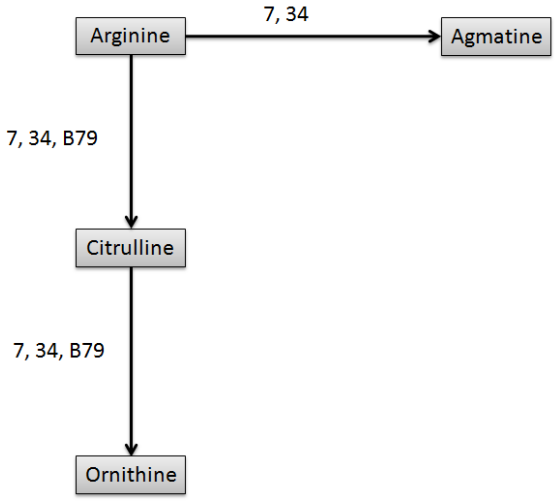


Fig. 15- Utilisation de l'arginine par les 3 souches de *O. oeni* 7, 34 et B79.

L'utilisation plus forte de l'arginine par la souche 7 d'une part et l'utilisation quasi-équivalente par la voie ADI et arginine décarboxylase lui confère peut-être un avantage par rapport aux 2 autres souches dans un milieu acide. Ceci expliquerait alors pourquoi elle se développe mieux dans le vin à pH 3,5 et que sa survie soit plus grande (§II du chapitre III). En effet, elle bénéficie de deux transports arginine/agmatine et arginine/ornithine, d'une consommation de protons plus grande, de la production de NH_3 qui augmente le pH extracellulaire et de la formation d'une mole ATP par mole d'arginine dégradée.

2- **Substrats préférentiels pour les souches**

Cette étude a pour but de comparer la capacité spécifique des souches (7, 34 et B79) à dégrader les précurseurs suivants : arginine, citrulline et ornithine. Les extraits cellulaires ont été obtenus sur des bactéries récoltées en fin de phase exponentielle de croissance. Les résultats sont donnés dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII – Consommation des précurseurs et métabolites produits par les 3 souches de *O. oeni* (7, 34 et B79) après 3h de réaction enzymatique

Souches	Précurseurs consommés (mmol.g prot^{-1})	Métabolites formés (mmol.g prot^{-1})			
	Orn	Arg	AGM	Cit	Put
7	6,61	0,95	4,82	0,14	ND
34	10,46	0,846	9,45	0,05	ND
B79	0,02	0	0	0,02	ND
	Cit	Arg	AGM	Orn	Put
7	13,97	0,86	5,47	7,06	ND
34	13,30	0,81	9,34	3,08	ND
B79	0,31	0,08	0	0,18	ND
	Arg	AGM	Orn	Cit	Put
7	103,82	55,66	47,27	0,32	ND
34	32,54	21,49	10,84	0,14	ND
B79	0,57	0	0,43	0,02	ND

AGM (agmatine), Arg (arginine), Orn (ornithine), Cit (citrulline), Put (putrescine)

ND= non détecté

Les quantités de précurseurs utilisés dépendent de la souche bactérienne mais aucune formation de putrescine n'a été observée. La souche B79 a une très faible capacité d'utilisation pour les trois composés testés. L'arginine est le substrat préférentiel pour les trois souches étudiées. Une forte proportion d'ornithine est formée à partir de l'arginine très supérieure à celle formée à partir de la citrulline. Nous confirmons également que *O. oeni* est capable d'utiliser la citrulline du milieu.

L'agmatine peut donc être synthétisée par les deux souches productrices 7 et 34 à partir de l'arginine mais aussi de l'ornithine et de la citrulline. Ceci avait déjà été montré chez *Lactobacillus hilgardii* (Arena et Manca de Nadra, 2001).

.

3- **Activités enzymatiques mesurées au cours de la croissance cellulaire**

Les 3 souches ont été cultivées dans le milieu LAC à pH 5,3. Des prélèvements correspondants au début, au milieu et à la fin de la phase exponentielle de croissance ont été réalisés (Fig. 16). Pour chaque prélèvement des extraits cellulaires ont été obtenus.

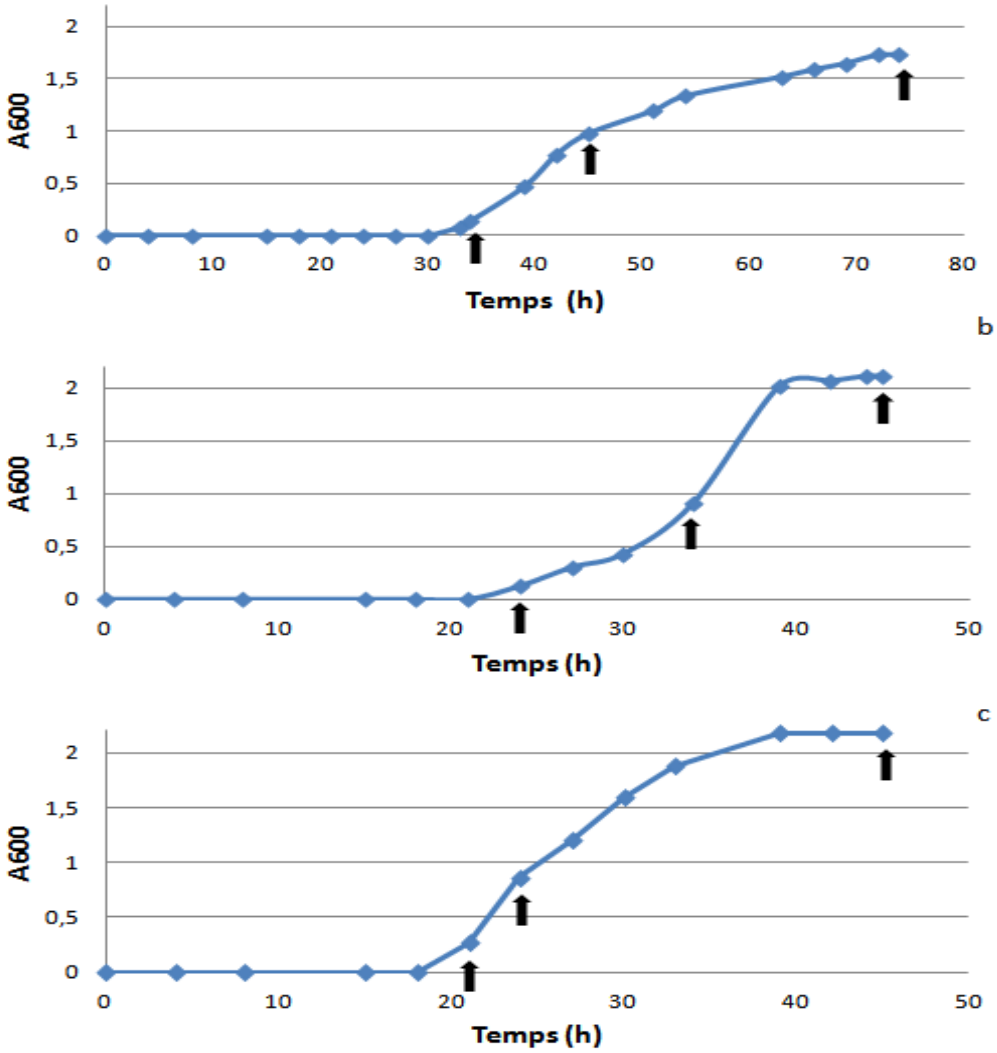


Fig. 16 – Croissance des 3 souches de *O. oeni* : 7 (a), 34 (b) et B79 (c) sur milieu LAC en fonction du temps (en heure).
Les flèches indiquent les moments des prélèvements.

Les différents métabolites liés à la dégradation de l'arginine par les trois souches de *O. oeni* (7, 34 et B79) ont été dosés par RP-HPLC. La citrulline étant un intermédiaire dans la voie ADI, sa concentration résiduelle dosée dans le milieu ne nous permet pas de calculer l'activité enzymatique arginine déiminase ; seules les activités enzymatiques ADC (arginine décarboxylase) et OTC (ornithine transcarbamylase) ont été calculées (Fig. 17).

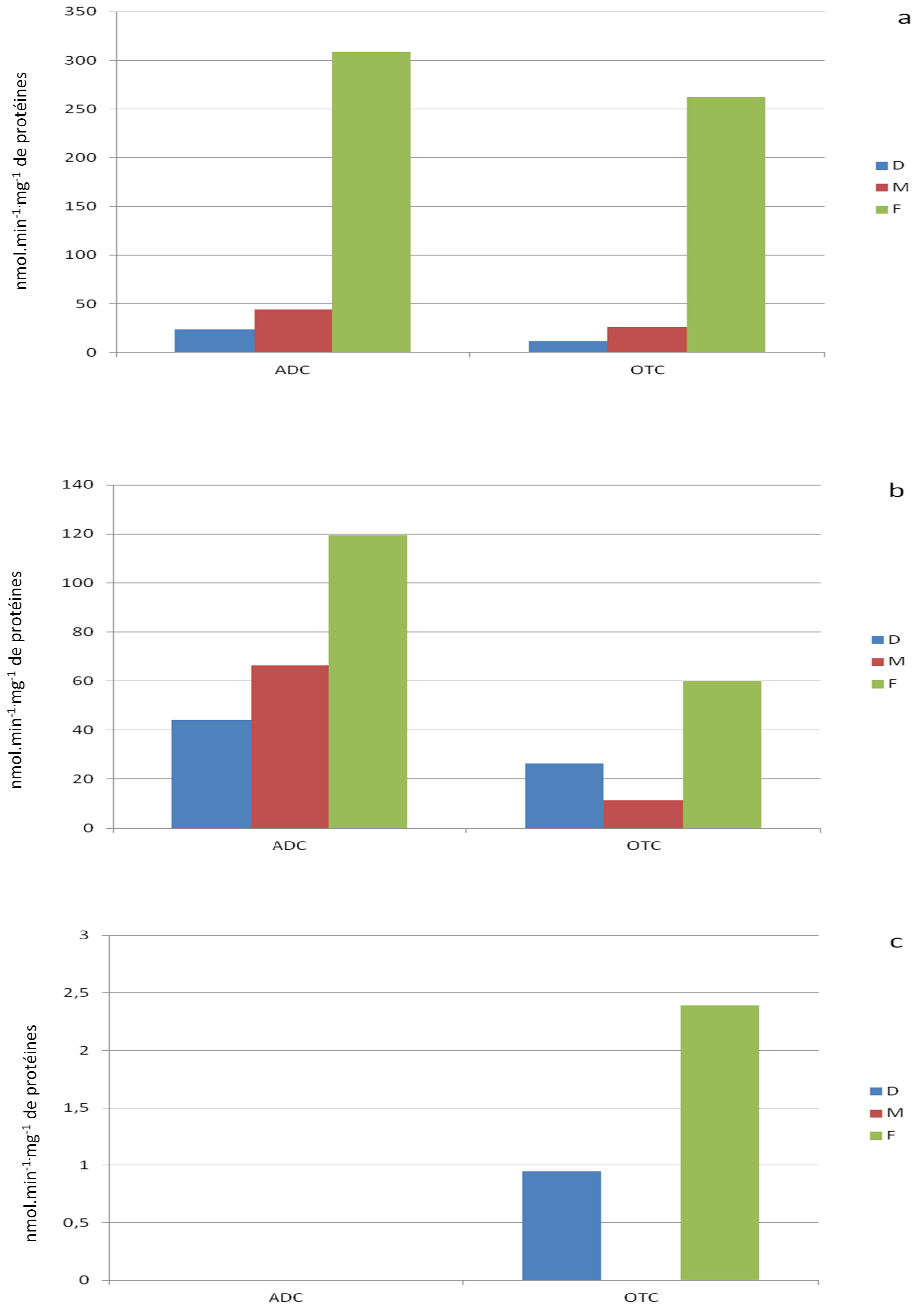


Fig. 17 - Activités enzymatiques ADC et OTC au cours de la croissance des souches de *O. oeni* 7 (a), 34 (b) et B79 (c).
D = début, M = milieu et F = fin de phase exponentielle de croissance.

Les activités enzymatiques ADC et OTC sont hétérogènes d'une souche à l'autre mais elles augmentent pour toutes les souches très fortement en fin de phase exponentielle de croissance ou en début de phase stationnaire. L'activité ADC atteint 309 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines pour la souche 7 et 119 pour la souche 34. L'activité OTC est de 262 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ de protéines pour la souche 7, 60 pour la souche 34 et seulement 2,4 pour la souche B79.

Ces résultats ont déjà été observés par plusieurs auteurs que ce soit pour l'utilisation de l'arginine ou d'autres acides aminés précurseurs. Rimeaux *et al.* (2011) montre en effet une activation de la transformation de l'arginine chez *L. sakei* en phase stationnaire. Chez *L. brevis*, la conversion tyrosine en tyramine est maximale en fin de phase exponentielle (Moreno-Arribas *et al*., 2000). Chez *Lactobacillus sp*. 30a, la forte synthèse d'histamine et de putrescine se voit lors de la phase stationnaire (Pessione *et al*.**,** 2005) ; ceci s'explique par une augmentation de l'expression du gène *hdc* lors de la phase de croissance bactérienne (Landete *et al*., 2006).

Cette augmentation des activités ADC et OTC est vraisemblablement pour les bactéries lactiques un mécanisme de réponse à un stress qui devient plus nécessaire en fin de phase exponentielle, milieu plus limitant nutritionnellement (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994)), et qui permet ainsi de produire de l'énergie supplémentaire et de réguler le pH (Arena *et al.*, 2011 ; Liu et Pilone, 1998).

IV - Effet de l'agmatine sur la perception olfactive du vin

Des vins possédant des teneurs élevées en putrescine et cadavérine ont été décrits comme renfermés, peu fruités au nez et masquant en partie la typicité du cépage (Palacios*et al.*, 2004). De plus, plus de 50 % de membres d'un jury de dégustations, consommateurs de vins et non experts, ont perçu un défaut dans des vins ayant des concentrations non nulles en cadavérine et putrescine (Silvano, 2008). L'objectif de cette étude est donc de déterminer pour la première fois l'impact de l'agmatine, amine biogène non toxique, sur la perception olfactive d'un vin blanc issu du cépage Chardonnay et d'un vin rouge issu du cépage Pinot noir.

Les concentrations testées retenues pour l'agmatine sont 15, 30, 60 et 120 $mg.L^{-1}$. La concentration moyenne la plus élevée répertoriée dans la littérature pour des vins rouges s'élève à 21,6 $mg.L^{-1}$ (Bauza*et al.*,1995a). Ces auteurs notent cependant que 1/3 des 84 vins qu'ils ont analysés possèdent des teneurs supérieures à 20 $mg.L^{-1}$. Ayant montré qu'une souche de *Oenococcus oeni* (chapitre III § I) a été capable d'en produire 120 $mg.L^{-1}$ dans un milieu synthétique, il nous a paru intéressant d'évaluer l'effet de l'agmatine jusqu'à 120 $mg.L^{-1}$ même si pour le moment cette amine n'a jamais été recensée à une telle concentration dans les vins.

1 - Effet d'une addition de sulfate dans le vin sur la perception olfactive

L'agmatine en poudre se présente sous forme de sulfate d'agmatine. Nous devons donc dans un premier temps vérifier si une addition de sulfate dans le vin modifie ou non la perception olfactive de celui-ci. Actuellement, l'impact d'une concentration élevée en sulfates dans les vins est reportée seulement au niveau gustatif en donnant une certaine amertume voire assèchement de la bouche (Feuillat et Peyron, 1998). Les résultats de la première série de test triangulaires, consacré à l'effet de l'adition d'ions SO_4 uniquement, sont présentés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV - Nombre de réponses correctes des tests triangulaires effectués pour étudier l'effet du sulfate sur la perception olfactive du vin

Test	Vin test	Vin témoin	Nombre de réponses correctes	Significativité
1	VR + 10,9 mg.L^{-1} de SO_4	Vin rouge	5/20	ns
2	VR + 21,8 mg.L^{-1} de SO_4	Vin rouge	9/20	ns
3	VR + 43,5 mg.L^{-1} de SO_4	Vin rouge	5/20	ns
4	VR + 87,1 mg.L^{-1} de SO_4	Vin rouge	11/20	*
5	VB + 10,9 mg.L^{-1} de SO_4	Vin blanc	9/20	ns
6	VB + 21,8 mg.L^{-1} de SO_4	Vin blanc	6/20	ns
7	VB + 43,5 mg.L^{-1} de SO_4	Vin blanc	2/20	ns
8	VB + 87,1 mg.L^{-1} deSO_4	Vin blanc	4/20	ns

ns= non significatif et *= significatif à 5%.

Au niveau du vin blanc, aucun des tests réalisés n'a montré de différences significatives entre le vin non supplémenté et le vin supplémenté. Concernant le vin rouge, seul l'ajout à 87,1 mg.L^{-1}de sulfate montre une différence significative avec le vin témoin. Le fait que seule la concentration la plus élevée en sulfate correspondant à la concentration en sulfate apportée par l'agmatine-sulfate pour une concentration souhaitée de 120 mg.L^{-1} d'agmatine, ait été détecté, n'est pas vraiment un problème pour la suite de l'étude. En effet, une telle concentration en agmatine paraît aujourd'hui assez invraisemblable dans les vins.

Le sulfate ne gêne visiblement pas la perception olfactive du vin blanc aux 4 concentrations testées et pour le vin rouge seule la dernière concentration a un impact. Ainsi l'effet du sulfate apporté par l'agmatine sulfate sera négligeable sur la perception olfactive des vins exceptée à la concentration correspondant à 120 $mg.L^{-1}$ d'agmatine qui, rappelons-le, n'a encore jamais été détectée à cette valeur dans les vins rouges.

2 - Effet d'une addition d'agmatine dans le vin sur la perception olfactive

L'ajout d'agmatine aux concentrations croissantes de 15, 30, 60 et 120 $mg.L^{-1}$ est ensuite testé dans le vin blanc et dans le vin rouge. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XXV.

Tableau XXV - Nombre de réponses correctes des tests triangulaires effectués pour étudier l'effet de l'agmatine(AGM) sur la perception olfactive du vin

Test	Vin test	Vin témoin	Nombre de réponses correctes	Significativité
1	VR + AGM 15 $mg.L^{-1}$	Vin rouge	8/20	ns
2	VR + AGM 30 $mg.L^{-1}$	Vin rouge	6/20	ns
3	VR + AGM 60 $mg.L^{-1}$	Vin rouge	6/20	ns
4	VR + AGM 120 $mg.L^{-1}$	Vin rouge	9/20	ns
5[£]	VB + AGM 15 $mg.L^{-1}$	Vin blanc	7/20	ns
6[£]	VB + AGM 30 $mg.L^{-1}$	Vin blanc	13/20	**
7[£]	VB + AGM 60 $mg.L^{-1}$	Vin blanc	6/20	ns
8[£]	VB + AGM 120 $mg.L^{-1}$	Vin blanc	7/20	ns

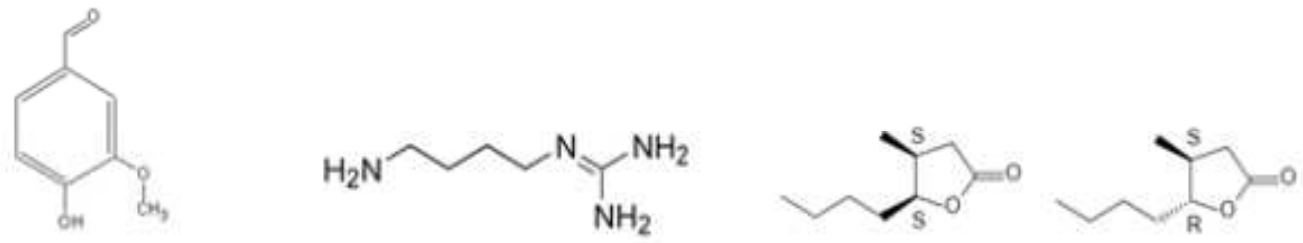
[£]expérience doublée avec des résultats identiques ns = non significatif et **= significatif à 1%.

Au niveau du vin rouge, aucun test triangulaire pour différencier le vin rouge témoin et le vin rouge auquel l'agmatine a été ajoutée pour toutes les concentrations, ne montre de résultats significatifs. Nos résultats montrent ainsi qu'une diminution de la qualité sensorielle des vins rouges par les amines biogènes ne le sera en aucune manière par la présence d'agmatine même en concentration élevée. Il est intéressant aussi de noter qu'à la concentration maximale, les sujets ne perçoivent plus un effet sulfate ; ceci pourrait être dû à un effet masquage par la présence d'agmatine.

Au niveau des vins blancs, on observe des différences significatives lorsqu'il a été demandé de comparer le vin blanc témoin et le vin blanc additionné de 30 $mg.L^{-1}$ d'agmatine. Ce résultat est assez surprenant car aucune différence significative n'est détectée pour les concentrations supérieures de 60 et 120 $mg.L^{-1}$. En effet, la relation psychophysique entre la concentration et la détection (ou l'intensité perçue) présente en général une pente positive. Dans notre cas nous avons trouvé un changement de pente à 30 $mg.L^{-1}$. Le test sur vin blanc a donc été dupliqué et les mêmes résultats ont été donnés par le jury.
Des ruptures et inversions de pente en fonction de la concentration de la substance à étudier ont déjà été montrées dans la littérature. C'est le cas par exemple pour la détermination du seuil de détection de l'α-ionone et qui a été observé par 6 sujets sur 7 (Marshall et Moulton, 1981). De plus il est fort connu que pour un certain de nombre de stimuli (notamment olfactifs), la nature de la sensation varie avec la grandeur du stimulus. Par exemple, le 2-*trans* nonénal, juste au-dessus de son seuil de perception (0,1 ppb) possède un caractère boisé (planche), au-dessus de 8 ppb il sent la graisse et il devient déplaisant à 30 ppb ; en solution aqueuse à 1000 ppb, l'aldéhyde à une forte odeur de concombre (Forss, 1981). Il est ainsi possible que la perception de l'agmatine ou que son effet sur les molécules odorantes du vin soit de cet ordre là. Cela pourrait expliquer alors pourquoi les dégustateurs perçoivent l'amine ou son effet dans le vin blanc à une concentration de 30 $mg.L^{-1}$ et non aux autres concentrations. Ce phénomène reste néanmoins à confirmer avec un autre panel et avec d'autres vins afin de valider le résultat obtenu pour cette concentration de 30 $mg.L^{-1}$et pour le vin testé.

Il semble donc que l'agmatine puisse avoir un impact sur la perception olfactive du vin blanc pour la concentration en agmatine de 30 $mg.L^{-1}$. Afin de comprendre cet effet, nous avons regardé les commentaires donnés par les dégustateurs. Plusieurs d'entre eux signalent une différence assez marquée au niveau de la perception olfactive du boisé entre les deux échantillons : vin témoin et vin contenant l'agmatine à 30 $mg.L^{-1}$. Le caractère boisé apparait très atténué dans le vin blanc

contenant l'agmatine. Une interaction serait donc envisageable entre des molécules responsables des arômes boisés et l'agmatine. Les deux isomères (*cis* et *trans*) de la whisky-lactone (noix de coco, boisé) et la vanilline (vanille) sont des composés bien connus à l'origine de l'arôme boisé de certains vins blancs (Chatonnet *et al.*, 1990) et notamment des vins blancs issus du cépage Chardonnay. L'atténuation du boisé pourrait être expliquée par une réaction entre la fonction amine primaire de l'agmatine et le groupement carbonyle de ces composés (Fig. 18) pour former une imine ou base de Schiff.



Vanilline Agmatine whisky-lactone (cis et trans)

Fig.18 - Structures de la vanilline, de l'agmatine et des 2 isomères de la whisky-lactone

Les bases de Schiff sont cependant généralement chimiquement instables (inversions tautomériques, hydrolyses, formation d'espèces ionisées) (Galic *et al.*, 1997), mais celles qui sont formées avec des aldéhydes aromatiques type vanilline peuvent être très stables (Munir *et al.*, 1985). Ces bases peuvent se faire en milieu hydro alcoolique (Ibrahim et Sharif, 2011), mais aussi à la chaleur et sous catalyse acide ou basique (Rauf, 2005).

Elles apparaissent donc probables dans le vin bien que son pH soit relativement bas, entre 3 et 4. Le fait que nous n'observons pas de perte du caractère boisé au-delà de 30 $mg.L^{-1}$ de l'amine pourrait peut-être s'expliquer par des mécanismes d'interaction avec la matrice du vin (synergies entre composés, présence des macromolécules protéiques et/ou polysaccharidiques…). De telles réactions ont déjà été envisagées d'un point de vue analytique et mécanistique pour expliquer la grande variété olfactive trouvée dans certains vins modèles contenant de la cystéine et des dérivés carbonylés provenant de la dégradation Maillard et Strecker (Pripis-Nicolau *et al*., 2000).

La validation de ces différentes hypothèses et notamment la possibilité de réaction entre l'agmatine et la vanilline en milieu acide hydro-alcoolique synthétique a été testée au sein du

laboratoire. Nous avons utilisé la propriété de certaines bases de Schiff d'être fluorescentes : cas par exemple vu en milieu acide entre la vanilline et la 4,5-diméthyl-o-phénylènediamine (Katayama *et al*., 1987). L'agmatine pourrait-elle ainsi libérer ou au contraire inhiber certaines notes de boisé en présence de vanilline en formant ces bases de Schiff comme décrit sur la figure 19 ?

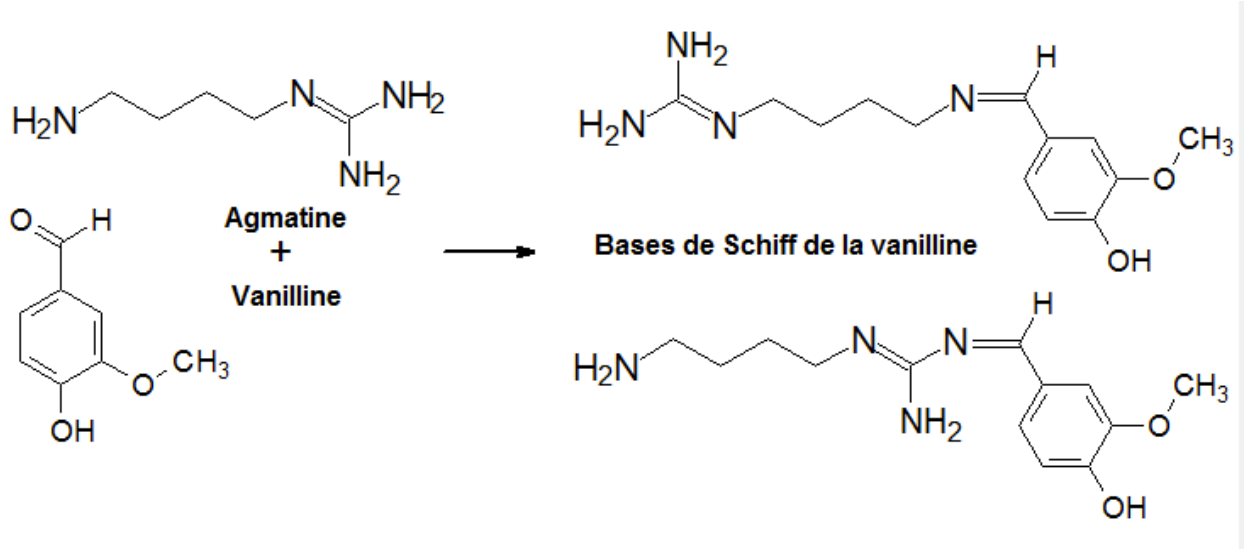


Fig.19 - Réaction de formation des bases de Schiff possibles de l'agmatine avec la vaniline

La stratégie utilisée a consisté à chercher la présence de ces bases de Schiff dans différentes solutions de vins modèles par spectroscopie de fluorescence. Les spectres d'émission de l'agmatine et de la vanilline ainsi que de leur mélange en milieu hydro-alcoolique sont donnés sur la figure 20.

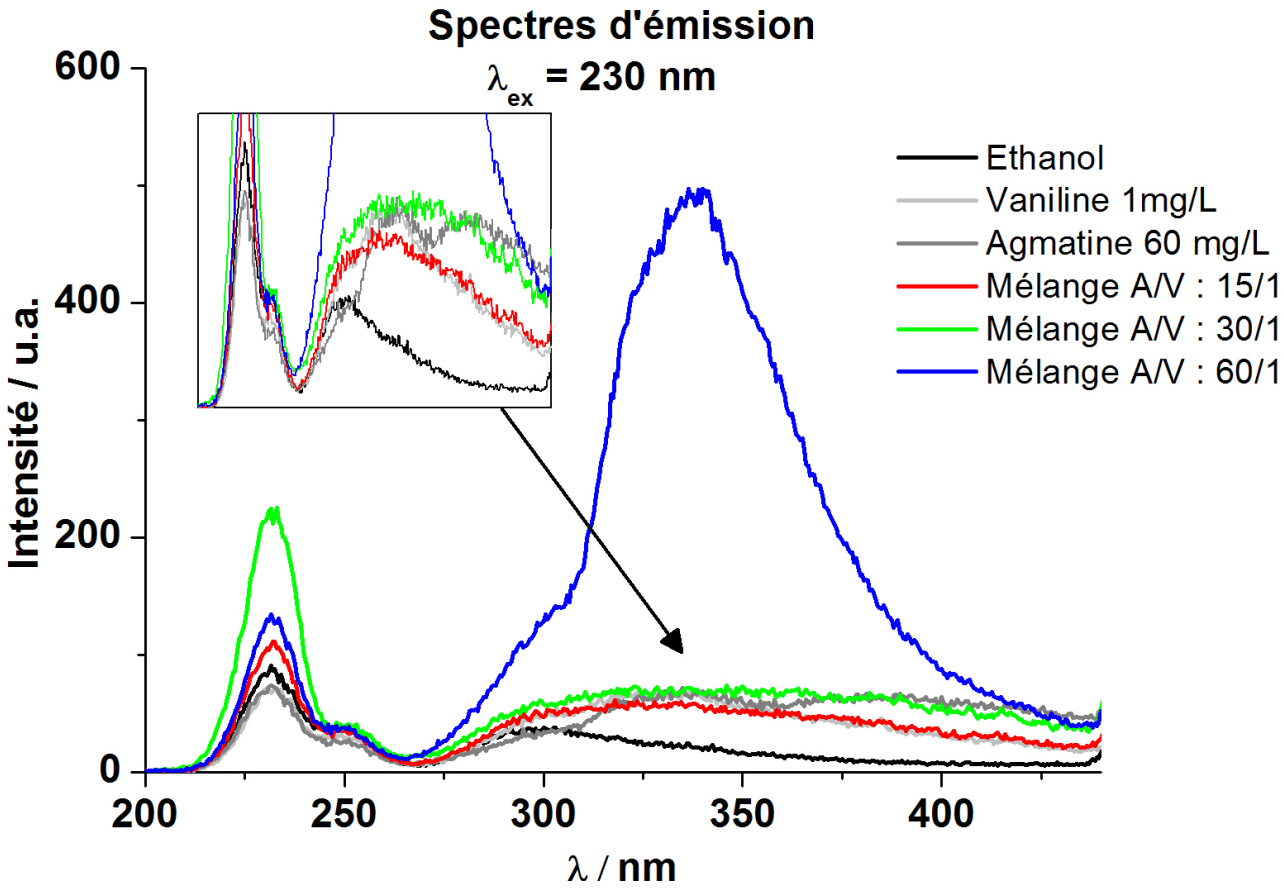


Fig. 20 - Spectres de fluorescence de la vanilline, de l'agmatine
et de leur mélange en milieu hydro-alcoolique.

Longueur d'onde d'excitation fixée à 230 nm.
Mélange testé avec différents rapports d'agmatine (A) : 60, 30 et 15 mg.L^{-1} et de vanilline (V) à 1 mg.L

Les trois mélanges contenant l'agmatine et la vanilline présentent une large bande d'émission centrée sur 340 nm, un épaulement à 300 nm, également présent dans la vanilline seule et un deuxième épaulement à 380 nm, aussi présent dans l'agmatine seule. Cette fluorescence traduit des interactions **π-π***de la solution hydro-alcoolique sous une excitation de 230 nm.

Le spectre d'émission du mélange contenant 60 mg.L^{-1} d'agmatine et 1 mg.L^{-1} de vanilline présente sa bande d'émission centrée sur 340 nm environ et elle apparait 5 fois plus intense comparée aux deux autres mélanges.

Cette augmentation de l'intensité de fluorescence pourrait s'expliquer par l'intervention d'une base de Schiff de la vanilline avec l'agmatine sous certaines conditions de concentrations d'amine biogène. Afin d'expliquer la faisabilité ou non de cette réaction, une étude cinétique devra être explorée pour valider ce résultat.

Le rôle de ces bases de Schiff dans le vin demeure mystérieux mais une telle méthodologie comme précédemment initiée devrait élucider des problèmes concrets relatifs au sensoriel. L'importance de la fraction macromoléculaire, comme les protéines, semble influencer l'expression de la fluorescence des imines (Gharagozlou et Boghaei, 2008). Le fait que la diminution du boisé soit observée dans le vin pour 30 $mg.L^{-1}$ et la formation probable d'une base de Schiff à 60 $mg.L^{-1}$ et non 30 $mg.L^{-1}$ en milieu synthétique peut s'expliquer par les différences de composition des matrices utilisées. Il faudra refaire ces expériences en complexifiant le milieu modèle synthétique avec des apports de protéines et de polysaccharides notamment.

En conclusion, nous pouvons dire que la présence d'agmatine dans un vin rouge de Pinot noir n'aura aucun impact sensoriel. Pour le vin de Chardonnay, un seuil de détection ou de modification de perception olfactive a été trouvé autour de 30 $mg.L^{-1}$. Cette concentration d'agmatine reste cependant très supérieure à celles trouvées naturellement dans les vins blancs. Ainsi en conditions naturelles, l'agmatine ne devrait pas gêner la perception olfactive des vins issus des deux cépages testés.

Conclusion

La première partie de ce travail a été consacrée à l'isolement de 80 souches de bactéries lactiques à partir de vins rouges. Nous avons choisi des vins rouges de pH supérieurs à 3,6 pour tenter d'isoler des souches appartenant aux différents genres rencontrés dans les vins à savoir *Oenococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Mais toutes les souches isolées (80) se sont avérées être des souches de l'espèce *Oenococcus oeni*. Nous avons tout d'abord recherché chez ces souches la présence de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des amines biogènes et plus particulièrement quatre amines couramment rencontrées dans les vins à savoir la putrescine, l'histamine, la tyramine et la phényléthylamine. Ensuite, nous avons pour les souches porteuses de ces gènes d'intérêt caractérisé leur auxotrophie vis-à-vis des acides aminés précurseurs (respectivement arginine, histidine, tyrosine et phénylalanine), afin de savoir si une bactérie auxotrophe vis-à-vis d'un acide aminé précurseur d'une amine biogène produit plus de cette amine en présence de cet acide aminé qu'une souche non auxotrophe vis-à-vis de cet acide aminé. La détermination de la production d'amines pour les 5 souches retenues a été réalisée dans un milieu de culture chimiquement défini à pH 5,3 et adapté à la croissance des bactéries lactiques.

Les souches se sont avérées non productrices de tyramine et très faiblement productrices de putrescine et de phényléthylamine (moins de 1 $mg.L^{-1}$ dans le milieu). Cependant, nous mettons en évidence, pour la première fois, une synthèse non négligeable d'agmatine (décarboxylation de l'arginine) dans le milieu chimiquement défini pour quatre souches de *Oenococcus oeni* sur les cinq souches retenues. Les concentrations dosées sont comprises entre 60 et 90 $mg.L^{-1}$ pour les souches 23, 26 et 34 et atteignent 120 $mg.L^{-1}$ pour la souche 7 la plus productrice.

Les relations entre l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé, la présence des gènes impliqués dans la synthèse de l'amine correspondante et la production de cette amine dans le milieu extracellulaire ne peuvent être examinées que pour l'arginine et pour la tyramine. En effet, pour l'histamine, la souche auxotrophe ne possède pas le gène *hdc* et les deux souches porteuses du gène *hdc* ne sont pas auxotrophes. Les 4 souches auxotrophes vis-à-vis de l'arginine et porteuses du gène *odc* et des gènes du cluster *arc* (7, 34, 26 et 23) ne synthétisent pas plus de putrescine que la souche 37 non auxotrophe porteuse, elle-aussi, du gène *odc* et des gènes du cluster *arc*. Par contre, ces 4 souches synthétisent de plus grandes quantités d'agmatine que la souche non auxotrophe dans le milieu chimiquement défini à pH 5,3 mais cette plus forte production ne sera

pas retrouvée dans les autres milieux de culture (vin à pH 4,5, vin à pH 3,5 et milieu chimiquement défini à pH 4). Pour la tyramine, les deux souches auxotrophes et porteuses du gène *tyrdc* ne produisent pas plus de cette amine que les deux souches non auxotrophes également porteuses du gène *tyrdc*. Il n'existe donc pas de relation nette entre l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé et la production de l'amine biogène correspondant. La présence dans le milieu de l'acide aminé dont la bactérie est auxotrophe n'induit pas du tout de synthèse accrue de l'amine biogène correspondant. Comme les souches bactériennes utilisées n'ont vraisemblablement pas le même fond génétique, il faudra poursuivre ce travail avec des souches bactériennes productrices d'amines lorsque des outils adaptés à la manipulation génétique de *Oenococcus oeni* seront disponibles (i) en comparant le profil d'auxotrophie de souches et la production d'amines, (ii) en modifiant génétiquement ces mêmes souches afin de leur apporter les gènes impliqués dans la biosynthèse des amines et (iii) en comparer de nouveau le profil d'auxotrophie et la production d'amines.

Par ailleurs, nous confirmons que la présence chez la bactérie d'un gène codant une enzyme impliquée dans la synthèse d'une amine ne conduit pas nécessairement à sa production dans le milieu extracellulaire. Il serait maintenant nécessaire d'étudier plus précisément l'expression des gènes et leur régulation en fonction des conditions de culture par PCR quantitative en temps réel.

La production des amines a été quantifiée dans des milieux de culture différents par leur richesse en acides aminés précurseurs, leur effet stressant (éthanol, acide malique…) et leur niveau d'acidité pour les cinq souches isolées et pour une souche de laboratoire.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de lien entre le niveau de population bactérienne et la concentration en amines produites dans le milieu.

Une plus grande disponibilité dans le milieu de culture d'acides aminés précurseurs n'est pas liée à une plus forte synthèse par les bactéries des amines correspondantes.

L'augmentation de l'acidité dans les milieux se traduit par une nette diminution de la concentration dosée de l'amine majoritaire (agmatine) ; elle est de plus de 70% en milieu chimiquement défini et de plus de 50% en vin. Enfin, les dosages des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'arginine dans les extraits cellulaires montrent que leur synthèse est maximale en fin de phase exponentielle de croissance.

La plus faible production d'amines par les bactéries lorsque l'acidité du milieu augmente indique que la synthèse d'amines joue sans doute un rôle assez mineur dans l'adaptation des souches.

La quantité et la diversité des amines produites à biomasse formée équivalente sont différentes selon les souches bactériennes et surtout apparaissent très influencées par le milieu de culture. Les teneurs produites sont, pour toutes les souches et pour les 2 pH considérés, supérieures dans le milieu vin ce qui peut être le reflet d'un mécanisme d'adaptation à un milieu moins riche nutritionnellement et plus stressant (éthanol, dioxyde de soufre, acides gras, acidité….). Ainsi, la souche 7 qui se développe le mieux à faible pH est effectivement celle qui produit le plus d'agmatine. Cette souche est aussi celle qui consomme le plus d'arginine et qui utilise à proportion équivalente les deux voies : la voie de l'arginine déiminase (voie ADI) et la voie de l'arginine décarboxylase (ADC). La souche B79 qui se développe le moins bien n'utilise que faiblement l'arginine et que par la voie ADI. En fait, sur un milieu appauvri nutritionnellement, cas du vin en fin de fermentation alcoolique, la souche 7 trouve vraisemblablement un moyen supplémentaire de générer de l'énergie métabolique sous forme d'ATP par l'utilisation de l'arginine avec la voie ADI, de générer une fpm (ADI et ADC) et aussi d'augmenter le pH extracellulaire (perte d'une fonction acide COOH par l'activité arginine décarboxylase ADC et production de NH_3 par la voie ADI). Les activités enzymatiques : ADC et OTC (ornithine transcarbamylase) augmentent très significativement au cours de la croissance cellulaire et apparaissent maximales en fin de phase exponentielle. Or la souche 7 est aussi la souche qui a le meilleur taux de survie dans le milieu vin acide. La synthèse d'amines pour *O. oeni* est certainement un mécanisme mis en jeu pour se développer et survivre dans un milieu difficile comme celui du vin.

Dans un vin, des souches indigènes utilisant beaucoup l'arginine peuvent être un facteur de risque car même si elles synthétisent peu de putrescine elles-mêmes, l'ornithine excrétée dans le milieu peut être décarboxylée par d'autres souches odc^+ par association métabolique. Le fait que certaines souches puissent survivre dans le milieu et que les activités enzymatiques liées au métabolisme de l'arginine soient maximales en fin de phase exponentielle de croissance représente un risque potentiel non négligeable d'altération du vin lors de son élevage. Les teneurs en amines pourraient augmenter de manière importante ; ceci est d'ailleurs souvent observé dans les conditions de la pratique et l'élimination des bactéries après la fermentation malolactique apparaît nécessaire afin de diminuer le risque d'apparition de ces amines.

Certaines souches s'avèrent capables de synthétiser des quantités élevées d'agmatine. Aussi, il sera nécessaire de poursuivre ce travail afin de caractériser l'enzyme responsable de la décarboxylation de l'arginine puisqu'il n'existe pas de gène codant l'arginine décarboxylase dans le génome de *Oenococcus oeni.*

L'effet d'une addition d'agmatine sur la perception olfactive de vins blancs et de vins rouges a été testé compte tenu des concentrations d'agmatine produites par certaines de nos souches isolées.

La perception olfactive sur le vin rouge issu de Pinot noir même avec des ajouts en concentrations élevées n'est pas du tout modifiée. Par contre, pour le vin blanc de Chardonnay, un seuil de modification de perception olfactive a été trouvé autour de 30 $mg.L^{-1}$. Cette concentration étant nettement supérieure à celles couramment dosées dans les vins blancs, l'agmatine ne devrait pas gêner la perception olfactive dans les conditions de vinification.

L'atténuation du boisé, qui a été décrite par le jury de dégustateurs dans les lots enrichis en agmatine à la dose de 30 $mg.L^{-1}$, pourrait s'expliquer par une réaction entre la fonction amine primaire de l'agmatine et le groupement carbonyle de composés d'arômes type vanilline et/ou whisky-lactones qui conduirait à la formation entre ces composés d'une base de Schiff. Cette hypothèse a été vérifiée en milieu synthétique et apparaît effectivement possible. Le fait que la diminution du boisé soit observée dans le vin pour 30 $mg.L^{-1}$ et la formation probable d'une base de Schiff dans le milieu synthétique pour 60 $mg.L^{-1}$ et non pour 30 $mg.L^{-1}$ peut être du aux différences de composition des matrices utilisées.

Ce travail mérite d'être approfondi avec d'autres amines telles que la putrescine, la cadavérine et l'histamine et d'autres matrices vins (issus de cépages et/ou de millésimes différents). L'utilisation d'un milieu modèle plus complexe et plus proche d'une matrice vin, avec notamment la présence de polysaccharides et de protéines, sera nécessaire. Ces futures études devraient permettre de mieux élucider dans le vin le rôle des bases de Schiff qui aujourd'hui est peu ou non compris.

Références bibliographiques

A

Aerny, J. (1985). Origin of histamine in wines. *Bulletin de l'OIV*, 58(656-657): 1016-1019.

AFNOR (1995). Contrôle de la qualité des produits alimentaires, V: 09-013.

Alberto, M.R., Arena, M.E., et Manca de Nadra, M.C. (2002). A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. *Food Control*, 13: 125-129.

Alberto, M.R., Arena, M.E., et Manca de Nadra, M.C. (2007). Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control*, 18(8): 898-903.

Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M., Martín-Álvarez, P.J., et Polo, M.C. (2007). Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*, 103(2): 572-581.

Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., et Feuillat, M. (2001). Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnolgy*, 26: 335-240.

Ali, M.A., Poortvliet, E., Strömberg, R., et Yngve, A. (2011). Polyamines in foods: development of a food database. *Food and Nutrition Research*, 55, 5572 (15 p).

Anli, R.E., Vural, N., Yılmaz, S., et Vural, Y.H. (2004). The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(1): 53-62.

Araque, I., Reguant, C., Rozès, N., et Bordons, A. (2011). Influence of wine-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria. *International Microbiology*, 14(4): 225-233.

Aredes Fernández, P.A., Farías, M.E., et Manca de Nadra, M.C. (2010). Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. *Biotechnology Letters*, 32(8): 1095-1102.

Arena, M.E., Saguir, F.M., et Manca de Nadra, M.C. (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 155-161.

Arena, M.E., et Manca de Nadra, M.C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2): 158-162.

Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C., et Muñoz, R. (2002). The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene*, 301(1): 61-66.

Arena, M.E., et Manca de Nadra, M.C. (2005). Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*, 156: 858-864.

Arena, M.E., Fiocco, D., Manca de Nadra, M.C., Pardo, I., et Spano, G. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current Microbiology*, 55: 205-210.

Arena, M.P., Romano, A., Capozzi, V., Beneduce, L., Ghariani, M., Grieco, F., Lucas, P., et Spano, G. (2011). Expression of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 tyrosine decarboxylase and agmatine deiminase genes in wine correlates with substrate availability. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4): 395-402.

Assad-Garcia, J.S., Bonnin-Jusserand, M., Garmyn, D., Guzzo, J., Alexandre, H., et Grandvalet, C. (2008). An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4): 333-338.

B

Bach, B., Le Quere, S., Guillemin, M., Hennion-Imbault, A., Grimbaum, M., Colas, S., Massini, L., Barnavon, L., et Vuchot, P. (2012). Biogenic amines in Rhône Valley wines : a survey over 15 years (1995 to 2010). *In* : Darriet, P., Geny, L., Lucas, P., Lonvaud, A., de Revel, G., et Teisseidre, P.L. (Ed). Oeno 2011. Dunod, France, pp. 876-881.

Bardocz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6(10): 341-346

Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., et Cabanis, J.C. (1995a). Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du Rhône by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 707(2): 373-379.

Bauza, T., Blaise, A., Teisseidre, P.L., Mestres, J.P., Daumas, F., et Cabanis, J.C. (1995b). Evolution des teneurs en amines biogènes des moûts et des vins. *Sciences des Aliments*, 15*:* 559-570.

Bauza, T., Kelly, M.T., et Blaise, A. (2007). Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Food Chemistry*, 105(1): 405-413.

Beneduce, L., Romano, A., Capzzi, V., Lucas, P., Barnavon, L., Bach, B., Vuchot, P., Grieco, F., et Spano, G. (2010). Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*, 60(4): 573-578.

Bjeldanes, L.F., Schutz, D.E. et Morris M.M., (1978). On the aetiology of scombroid poisoning : cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16(2): 157-159.

Bjornsdottir, K., Bolton, G.E., McClellan-Green, P.D., Jaykus, L.A., et Green, D.P. (2009). Detection of Gram-Negative Histamine-Producing Bacteria in Fish: A Comparative Study. *Journal of Food Protection*, 72(9): 1987-1991.

Bonnin-Jusserand, M. (2011). Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. PhD thesis, Université de Bourgogne.

Bonnin-Jusserand, M., Grandvalet, C., David, V., et Alexandre, H. (2011). Molecular cloning, heterologous expression, and characterization of ornithine decarboxylase from *Oenococcus oeni*. *Journal of Food Protection*, 74(8): 1309-1314.

Bover-Cid, S., et Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1): 33-41.

Bover-Cid, S., Iquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A., et Vidal-Carou, M.C. (2006). Biogenic mono-, di-and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry*, 96(1): 43-47.

Brillet, A. (2005). Sélection et caractérisation de souches de *Carnobacterium* pour la biopréservation du saumon fumé. PhD thesis, Université de Nantes.

Broquedis, M., Dumery, B., et Brouard, J. (1989). Mise en evidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine, spermidine et spermine) dans les feuilles et les grappes de Vitis vinifera. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 23(1): 1-6.

Busto, O., Guasch, J., et Borrull, F. (1996). Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *Journal of Chromatography A*, 737(2): 205-213.

Buteau, C., Duitschaever, C.L., et Ashton, G.C. (1984). A study of the biogenesis of amines in a Villard Noir wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(4): 228-236.

C

Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Fiocco, D., Alvarez, M.A., Grieco, F., et Spano, G. (2012). Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum* : toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-6.

Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., et Romano, P. (2002). Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2): 159-163.

Cavin, J.F., Prevost, H., Lin, J., Schmitt, P., et Divies, C. (1989). Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3): 751-753.

Charpentier, C., et Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. *In* : Fleet G.H. (Ed). Wine Microbiology and Biotechnolgy. Harwood Academic Publishers, Suisse, PP. 225-242.

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

Chatonnet, P., Boidron, J.N., et Pons, M. (1990). Elevage des vins rouges en fûts de chêne : évolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sciences des Aliments*, 10(3): 565-587.

Constantini, A., Cersosimo , M., del Prete, V., Garcia-Moruno, E. (2006). Production of biogenic amine by lactic acid bacteria, screening by PCR, thin layer chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*, 69: 391-396.

Cooper, R.A. (1997). On the amine oxidases of *klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, 146(1): 85-89.

Cortacero-Ramírez, S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., et Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100(1): 383-389.

Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A., et Lonvaud-Funel, A. (1998). Histamine producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2): 199-204.

Coton, M., Coton, E., Lucas, P., et Lonvaud, A. (2004). Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiology*, 21: 125-130.

Coton, E., et Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine-and tyramine producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3): 296-304.

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., et Coton, E. (2010a). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8): 1078-1085.

Coton, E., Mulder, N., Coton, M., Pochet, S., Trip, H., et Lolkema, J.S. (2010b). Origin of the putrescine-producing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 5570-5576.

Csomos, E., et Simon-Sarkadi, L. (2002). Characterisation of Tokaj wines based on free amino acids and biogenic amines using ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, 56(1): 185-188.

Cueva, C., García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E., Bartolomé, B., Martín-Alvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F., et Moreno-Arribas, M.V. (2012). Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4): 672-682.

D

Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H., et Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1): 107-114.

de Borba, B.M., et Rohrer, J.S. (2007). Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1155(1): 22-30.

del Prete, V., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., et Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine : The role of grapes. *Food Chemistry*, 112(2): 474-481.

Delfini, C. (1989). Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sciences des Aliments*, 9(2): 413-416.

Diaz-Cinco, M.E., Fraijo, O., Grajeda, P., Lozano-Taylor, J., et Mejía, E.G. (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine and tyramine. *Journal of Food Science*, 57(2): 355-356.

Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E., et Lonvaud-Funel, A. (2003). Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4): 738-746.

Draper, L.R., Gyure, L.A., Hall, J.G., et Robertson, D. (1983). Effect of alcohol on the integrity of the intestinal epithelium. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(5): 399-404.

Dumoulin, M., Barthas, S. (2009). Amines biogènes dans les vins : ce qu'il faut savoir. *Revue des Œnologues,*133*:* 24-25.

E – F

EFSA (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal 2011*, 9(10): 2393 (93 p.).

Farias, M.E., Manca de Nadra, M.C., Rollan, G.C., et Strasser de Saad, A.M. (1993). Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27(3) : 191-199.

Fernandes, J.O., et Ferreira, M.A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886(1-2): 183-195.

Fernandez, M., Linares, D.M., et Alvarez, M.A. (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of Lactococcus lactis IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(11): 2521-2529.

Feuillat, M., et Peyron, D. (1998). Vinification par macération préfermentaire à froid du Pinot noir. In : Flanzy, C., Œnologie : fondements scientifiques et technologiques, Tec & Doc, Lavoisier Ed, Paris, p. 764-773.

Forss, A. (1981). Sensory characterization. *Flavor Research*, 125-174

.

Fourcassie, P., Makaga-Kabinda-Massard, E., Belarbi, A., et Maujean, A. (1992). Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc œnos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *Journal of Applied Microbiology*, 73(6): 489-496.

Friedman, R., Altman, A., et Levin, N.(1989). The effect of salt stress on polyamine synthesis and content in ming beans plants and in halophytes. *Plant Physiology*, 76: 295-302.

G

Galic, N., Cimerman, Z., et Tomisic, V. (1997). Tautomeric and protonation equilibria of schiff bases of salicylaldehyde with aminopyridines. *Analytica Chimica Acta*, 343(1): 135-143.

Garai-Ibabe, G., Irastorza, A., Dueñas, M.T., Martin-Alvarez, P.J., et Moreno-Arribas, V.M. (2012). Evolution of amino acids and biogenic amines in natural ciders as a function of the year and the manufacture steps. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2): 375-381.

Garcia-Moruno, E., et Munoz, R. (2012). Does *Oenococcus oeni* produce histamine ? *International Journal of Food Microbiology*, 157: 121-129.

García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E.M., Bartolomé, B., et Moreno-Arribas, M. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2): 115-120.

García-Villar, N., Saurina, J., et Hernández-Cassou, S. (2006). High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. *Analytica Chimica Acta* , 575(1): 97-105.

García-Villar, N., Hernández-Cassou, S., et Saurina, J. (2007). Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18): 7453-7461.

García-Villar, N., Hernández-Cassou, S., et Saurina, J. (2009). Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6387-6393.

.

Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.F., et Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1): 105-117.

Gardini, F., Zaccarelli, A., Belletti, N., Faustini, F., Cavazza, A., Martuscelli, M., Mastrocola, D., et Suzzi, G. (2005). Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*, 16(7): 609-616.

Garvie, E.I. (1967). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Ieuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology*, 48(3): 439-447.

Gerbaux, V., et Monamy C. (2000). Les amines biogènes dans les vins de Bourgogne - 1ère partie : Teneurs, origine et maîtrise dans les vins. *Revue Française d'Œnologie*, 183: 25-28.

Gerner, E.W., et Meyskens, F.L.(2004); Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4: 781-792.

Gharagozlou, M., et Boghaei, D.M. (2008). Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: Fluorescence and circular dichroism studies. *Spectrochimica Acta Part A*, 71(4): 1617-1622.

Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., et García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3): 608-613.

González Marco, A., et Ancín Azpilicueta, C. (2006). Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*, 99(4): 680-685.

Granchi, L., Romano, P., Mangani, S., Guerrini, S., et Vincenzini, M. (2005). Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bulletin de l'OIV*, 78(895-896): 595-610.

Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., et Vincenzini, M. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, 44: 374-378.

Guilloux-Benatier, M., et Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 746-751.

Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Gal, L., Guzzo, J., et Alexandre, H. (2006). Effects of yeast proteolytic activity on Oenococcus oeni and malolactic fermentation. *FEMS microbiology Letters*, 263(2): 183-188.

Guirard, B.M., et Snell, E.E. (1980). Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus sp*. 30a. *Journal of Biological Chemistry*, 255(12): 5960 -5964.

Guttart, A., Hernandez-Orte, P., et Cacho, J. (1997). Effects of maceration on the amino acid content of chardonnay musts and wines. *Vitis*, 36(1): 43-47.

H

Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., et Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5(2): 42-49.

Heloir, M.C. (1998). Recherches de marqueurs biochimiques de la vigne (*Vitis vinifera L.*) cultivée in situ et in vitro : résultats préliminaires. PhD thesis, Université de Bourgogne.

Henríquez-Aedo, K., Vega, M., Prieto-Rodríguez, S., et Aranda, M. (2012). Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines.*Food and Chemical Toxicology*, 50(8): 2742-2750.

Herbert, P., Santos, L., et Alves, A. (2001). Simultaneous quantification of primary, secondary amino acids, and biogenic amines in musts and wines using OPA/3-MPA/FMOC-CI fluorescent derivatives. *Journal of Food Science*, 66(9): 1319-1325.

Herbert, P., Cabrita, M.J., Ratola, N., Laureano, O., et Alves, A. (2005). Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*, 66(3): 315-322.

Hernández-Borges, J., D'Orazio, G., Aturki, Z., et Fanali, S. (2007). Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography A*, 1147(2): 192-199.

Hernández-Orte, P., Peña-Gallego, A., Ibarz, M.J., Cacho, J., et Ferreira, V. (2006). Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *Journal of Chromatography A*, 1129(2): 160-164.

Hernández-Orte, P., Lapeña, A.C., Peña-Gallego, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L., Ferrer, S., Cacho, J., et Ferreira, V. (2008). Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*, 41(7): 697-706.

Herr, P., Sommer, S., et Fisher, U. (2012). Concentration of biogenic amines in lees – absorption by yeast cell walls or amplified bacterial activity ? *In* : Darriet, P., Geny, L., Lucas, P., Lonvaud, A., de Revel, G., et Teisseidre, P.L. (Ed). Oeno 2011. Dunod, France, pp. 411-415.

Hlabangana, L., Hernández-Cassou, S., et Saurina, J. (2006). Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *Journal of Chromatography A*, 1130(1): 130-136.

I – J

Ibrahim, M.N., et Sharif, S.A.I. (2011). Synthesis, characterization and use of Schiff bases as fluorimetric analytical reagents (Part II). *Journal of Chemistry*, 8(1): 180-184.

Izquierdo Cañas, P.M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., Fernández González, M., et Palop Herreros, M.L.L. (2008). Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8): 731-735.

Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A., et Vidal-Carou, M.C. (2000). Effect of tyrosine on tyramine formation during beer fermentation. *Food chemistry*, 70(3): 329-332.

Jimenez Moreno, N., Torrea Goni, D., et Ancin Azpilicueta, C. (2003). Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19): 5732-5737.

Joosten, H.M., et Nortolt, M.D. (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Applied Environmental and Microbiology*, 55(9): 2356-2359.

K

Kalac, P., et Krízek, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2): 123-128.

Kanny, G., Bauza, T., Fremont, S., Guillemin, F., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J.C, Nicolas, J.P., et Moneret-Vautrin, D.A. (1999). Histamine content does not influence the tolerance of wine in normal subjects. *Allergie et Immunologie*, 31(2): 45-48.

Kanny, G., Gerbaux, V., Olszewski, A., Frémont, S., Empereur, F., Nabet, F., Cabanis, J.C., et Moneret-Vautrin, D.A. (2001). No correlation between wine intolerance and histamine content of wine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2): 375-378.

Karovicova, J., et Kohajdova, Z. (2005). Review : Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*, 59(1): 70-79.

Katayama, M., Mukai, Y., et Taniguchi, H. (1987). Fluorimetric determination of vanillin with 4,5-dimethyl-o-phenylenediamine. *Analytical Sciences*, 3: 369-372.

Kim, J.Y., Kim, D., Park, P., Kang, H.I., Ryu, E.K., et Kim, S.M. (2011). Effects of storage temperature and time on the biogenic amine content and microflora in Korean turbid rice wine, Makgeolli. *Food Chemistry*, 128(1): 87-92.

Kiss, J., et Sass-Kiss, A. (2005). Protection of originality of Tokaji Aszú: amines and organic acids in botrytized wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26): 10042-10050.

Kiss, J., Korbász, M., et Sass-Kiss, A. (2006). Study of amine composition of botrytized grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23): 8909-8918.

Klausen, N., et Lund, E. (1986). Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung*, 182(6): 459-463.

Konings, W.N., Poolman, B., et Driessen, A.J. (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Critical Reviews in Microbiology*, 16(6): 419-476.

Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., Van Veen, H.W., Poolman, B., et Driessen, A.J.M. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71(1): 117-128.

Kvasnicka, F., et Voldrich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103(1): 145-9.

L

Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., et Alvarez, M.A. (2010).Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6(2): 145-156.

Lagishetty, C.V., et Naik, S.R., (2008). Polyamines : potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacology*, 40: 121-125.

Landete, J.M., Ferrer, S., et Pardo, I. (2005a). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine ? *Journal of Applied Microbiology*, 99(3): 580-586.

Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L., et Pardo, I. (2005b). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4): 1119-1124.

Landete, J.M., Pardo, I., et Ferrer, S. (2006). Histamine, histidine, and growth-phasemediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated fromwine, *FEMS microbiology letters*, 260(1): 84–90.

Landete, J.M., Pardo, I., et Ferrer, S. (2007). Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3): 364-368.

Landete, J.M., Pardo, I., Ferrer, S. (2008). Regulation of hdc expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*, 105(5) :1544-1551.

Landete, J.M., Arena, M.E., Pardo, I., Manca de Nadra, M.C., et Ferrer, S. (2010). The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synyhesis from agmatine via agmatine deiminase. *International of Microbiology*, 13: 169-177.

Lee, J.A., Michael, A.J., Martynowski, D., Goldsmith, F.J., et Philips, M.A. (2007). Phylogenic diversity and the structural basis of substrate specificity in the β/α-barrel fold basic amino acid decarboxylases. *Journal of Biology and Chemistry*. 282: 27115-27125.

Lehtonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2): 127-133.

Leitão, M.C., Teixeira, H.C., Barreto Crespo, M.T., et San Romão, M.V. (2000). Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7): 2780-2784.

Lerm, E., Engelbrecht, L., et Du Toit, M. (2011). Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 32(2): 280-295.

Leuschner, R.G., Heidel, M., et Hammes, W.P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1): 1-10.

Li, J.S.., Wang, H., Huang, K-J., et Zhang, H-S.. (2006). Determination of biogenic amines in apples and wine with 8-phenyl-(4-oxy-acetic acid *N*-hydroxysuccinimide ester)-4, 4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 575: 255-261.

Li, Z., Wu, Y., Zhang, G. , Zhao, Y., et Xue, C. (2007). Survey of biogenic amines in chinese red wines. *Food Chemistry*, 105(4): 1530-1535.

Liu S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., et Pilone, G.J. (1994). Citrulline production and ethylcarbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2): 235-242.

Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J., et Pilone, G.J. (1995). Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1): 310-316.

Liu.,Q., Davis, C.R., et Brooks, J.D. (1995). Growth and metabolism of selected lactic-acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2): 166-174.

.

Liu, S.Q., et Pilone, G.J. (1998). A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, 84(3): 315-327.

Lolkema, J.S., Poolman, B., et Konings, W.N. (1996). Secondary transporters and metabolic energy generation in bacteria. *In* W.N. Konings, H.R. Kaback, and J.S. Lolkema (ed.). Handbook of biophysics. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 229-260.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1): 9-13.

.

Lonvaud-Funel, A., et Joyeux, A. (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producingstrain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology*, 77(4): 401-407.

López, I., Santamaría, P., Tenorio, C., Garijo, P., Gutiérrez, A.R., et López, R. (2009). Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2): 1005-1012.

Lucas, P., et Lonvaud-Funel, A. (2002). Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiology Letters*, 211(1): 85-89.

Lucas, P, Landete, J., Coton, M., Coton, E., et Lonvaud-Funel, A. (2003). The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 65-71.

Lucas, P.M., Wolken, W.A.M., Claisse, O., Lolkema, J.S., et Lonvaud-Funel, A. (2005). Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and environmental microbiology*, 71(3): 1417-1424.

Lucas, P.M., Blancato, V.S., Claisse, O., Magni, C., Lolkema, J.S., et Lonvaud-Funel, A. (2007). Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*, 153(7): 2221-2230.

Lucas, P.M., Claisse, O., et Lonvaud-Funel, A. (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3): 811-817.

M

Maijala, R., Nurmi, E., et Fischer, A. (1995). Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat science*, 39(1): 9-22.

Maintz, L., et Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5): 1185-1196.

Manca de Nadra, M.C., Nadra Chaud, C.A., Pesce de Ruiz, A. et Oliver, G. (1986). Synthesis of the arginine dihydrolase pathway enzymes in *Lactobacillus buchneri*. *Current Microbiology*, 13(5): 261-264.

Manfroi, L., Silva, P.H.A., Rizzon, L.A., Sabaini, P.S., et Glória, M.B.A. (2009). Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. *Food Chemistry*, 116(1): 208-213.

Mangani, S., Guerrini, S., Granchi, L., et Vincenzini, M. (2005). Putrescine accumulation in wine : role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*, 51: 6-10.

Marchand, S., Perello, M-C., et de Revel, G. (2012). Volatile and biogenic amines in Bordeaux red wine, the possibility of chemical generation. *In* : Darriet, P., Geny, L., Lucas, P., Lonvaud, A., de Revel, G., et Teisseidre, P.L. (Ed). Oeno 2011. Dunod, France, pp. 971-974.

Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V., et Munoz, R. (2004). Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 213-220.

Marcobal, A., Polo, M.C., et Martín-Álvarez, P.J. (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International*, 38(4): 387-394.

Marcobal, A., Martin-Alvarez, P.J., Polo, M.C., Munoz, R., et Moreno-Arribas, M.V. (2006). Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69(2): 397-404.

Marcobal, A., De las Rivas, B., Landete, J.M., Tabera, L., et Muñoz, R. (2012). Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(5): 448-67.

Marques A.P., Leitão M.C., Tenreiro R., et San Romão M.V. (2007). *Oenococcus oeni*: a putrescine producer. XXXº Congresso da OIV , Budapest, Hongrie.

Marques, A.P., Leitão, M.C., et San Romão, M.V. (2008). BiogMenic amines in wines : influence of oenological factors. *Food Chemistry*, 107(2): 853-860.

Marques, A.P., Zé-Zé, L., San-Romão, M.V., et Tenreiro, V. (2010). A novel molecular method for identification of *Oenococcus oeni* and its specific detection in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2): 251-255.

Marshall, D., et Moulton, D. (1981). Olfactometry sensitivity to ionon in humans and dogs *Chemical senses*, 6: 53-61.

Martın, M.C., Fernandez, M., Linares, D.M., et Alvarez M.A. (2005). Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology*, 151(4) :1219-1228.

Martín-Álvarez, P.J., Marcobal, Á., Polo, C., et Moreno-Arribas, M.V. (2006). Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*, 222(3): 420-424.

Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F., et Suzzi, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31(3): 228-232.

Maxa, E., et Brandes, W. (1993). Biogene amine in fruchtsäften. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 43(3): 101-106.

Maynard, L., et Schenker, V. (1962). Monoamine oxidase inhibition by ethanol in vitro. *Nature*, 196: 575-576.

McCabe-Sellers, B.J., Staggs, C.G., et Bogle, M.L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs : a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: S58-S65.

Millán, S., Sampedro, M.C., Unceta, N., Goicolea, M.A., et Barrio, R.J. (2007). Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 584(1): 145-152.

Miller, G. (1959). *Use* of DNS Acid Reagent for determination of reducing sugars., *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.

Mira de Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.Q., et Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1657-1662.

Molenaar, D., Bosscher, J.S., Ten Brink, B., Driessen, A.J., et Konings, W.N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175(10): 2864-2870.

Moreno, N.J., Goñi, D.T., et Azpilicueta, C.A. (2003). Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19): 5732-5737.

Moreno-Arribas, V., et Lonvaud-Funel, A. (1999). Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiology Letters*, 180(1): 55-60.

Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., et Lonvaud- Funel, A. (2000). Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4): 584-593.

Moreno-Arribas, M., Polo, C., Jorganes, F., et Munoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 117-123.

Moreno-Arribas, M., et Carmen Polo, M. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*, 25(7): 875-881.

Morrow, J.D., Margolies, G.R., Rowland, J., et Roberts, L.J. (1991). Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *New England Journal of Medicine*, 324(11): 716-720.

Munir, C., Yousaf, S.M., et Ahmad, N. (1985). Synthesis, characterization and pharmacological properties of a cobalt(II) complex of antibiotic ampicillin. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 7(4): 301-307.

N

Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., et Lucas, P.M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 594-599.

Nehmé, B., Ganga, M.A., et Lonvaud-Funel, A. (2006). The arginine deiminase locus of *Oenococcus oeni* includes a putative arginyl-tRNA synthetase ArgS2 at its 3'-end. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(5): 590-597.

O – P

Omura, Y., Price, R.J., et Olcott, H. (1978). Histamine forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *Journal of Food Science*, 43(6): 1779-1781.

Önal, A. (2006). A review : current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103: 1475-1486.

Palacios, A., Suárez, C., Krieger, S., Theodore, D., Otaño, L., Laucirica, A., et Pena, F. (2004). Influencia organoléptica de las aminas biógenas producidas durante la fermentación maloláctica del vino. *ACE Revista de Enologia* (http://www.acenologia.com/ciencia70_3).

Pena-Gallego, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., et Ferreira, V. (2009). Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction : a comparative study. *Journal of Chromatography A*, 1216: 3398-3401.

Pereira, C.I., Matos, D., San Româo, M.V., et Barreto Crespo, M.T. (2009). Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force. *Applied and Environmental Microbiology*, 752: 345-352.

Pérez-Serradilla, J.A., et Luque de Castro, M.D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111(2): 447-456.

Pessione, , E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giuffrida, M.G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., Conti, A., et Giunta, C. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*, 5(3): 687-698.

Pessione, E., Mazzoli, R., Lamberti, C., Coisson, D.J., Riedel, K., Mazolli, R., Bonetta, S., Ebert, L., et Giunta, C. (2009). First evidence of a membrane-bound, tyramine and beta-phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in Enterococcus faecalis: A two dimensional electrophoresis proteomic study. *Proteomics*, 9(10): 2695-2710.

Polo, L., Ferrer, S., Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., et Pardo, I. (2010). Biogenic amine synthesis; in high quality Tempranillo wines.Relationship with lactic acid bacteria and vinification conditions. *Annals of microbiology*, 61: 191-198.

Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., et Chassagne, D. (2008). Effects of yeast cell-wall characteristics on 4-Ethylphenol sorption capacity in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11854-11861.

Pramateftaki, P.V., Metafa, M., Karapetrou, G., et Marmaras, G. (2012). Assessment of the genetic polymorphism and biogenic amine production of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Greek red wines. *Food Microbiology*, 29(1): 113-120.

Prasad, G.L., et Adiga, P.R. (1986). Decarboxylation of arginine and ornithine by arginine decarboxylase purified from cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Journal of Biosciences*, 10(2): 202-213.

Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., et Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9): 3761-3766.

Proestos, C., Loukatos, P., et Komaitis, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry*, 106(3): 1218-1224.

R

Rao, S.B., Rao, K.S, et Mehendale, H.M. (1986). Absence of diamine oxidase activity from rabbit and rat lungs. *Biochemical Journal*, 234(3): 733-1986.

Rauf, A, (2005). Synthesis and biological studies of some Schiff base compounds and their transition metal complexes. PhD thesis, Université de Bahauddin Zakariya.

Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Guzzo, J., Alexandre, H., Krieger, S., et Guilloux-Benatier, M. (2006). *Oenococcus oeni* preference for peptides : qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Archives of Microbiology*, 185(6): 459-469.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., et Lonvaud, A. (2006). Microbiologie du vin et vinifications, Volume 1, 2nd Edition.

Rimeaux, T., Vrancken, G., Pothakos, V., Maes, D., De Vuyst, L., et Leroy, F. (2011). The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiology*, 28: 597-604.

Rodas, A.M., Ferrer, S., et Pardo, I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3): 412-422.

Rohn, L., Page, L., Borck, H., Horr, B., et Diel, F. (2005). Can histamine be tasted in wine ?. *Inflammation Research*, 54(1): 66-67.

Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Benduce, L., Spano, G., Murat, M-L., et Lucas, P. (2012). Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*, 135: 1392-1396.

Romano, A., Trip, H., Lonvaud-Funel, A., Lolkema, J.S., et Lucas, P.M. (2012). Evidence of two functionally distinct ornithine decarboxylation systems in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6) :1953-1961.

Romano, P., Capece, A., et Poeta, C. (2007). Biogenic amine formation in alcoholic fermentation. *Bulletin de l'OIV*, 80: 914-915.

Romero, R., Sánchez-Viñas, M., Gázquez, D., et Bagur, M.G. (2002). Characterization of selected Spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16): 4713-4717.

Rosi, I., Nannelli, F., et Giovani, G. (2009). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT-Food Science and Technology*, 42(2): 525-530.

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Sesena, S., et Palop, M.L. (2010). Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 230-235.

S

Saguir, F.M., et Manca de Nadra, M.C. (2002). Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2) : 295-301.

Sass-Kiss, A., Szerdahelyi, E., et Hajós, G. (2000). Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC. *Chromatographia*, 51(1): 316-320.

Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Kramer, R., et Burkovski, A. (2000). Polyamine transport and role of potE in response to osmotic stress in *Escherichia coli. Journal of Bacteriology*, 182(21): 6247-6249.

Schneider, I. (2011). Yeast in wine fermentation as headache amine in wine. *Obst-und Weinbeau*, 147(19): 4-7.

Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7): 675-690.

-Silvano, A. (2008). L'impact des amines biogènes sur le goût du vin est sous-estimé. Magazine de Lallemand Tour 2008. (www.llallemandwine.com).

Simó, C., Moreno-Arribas, M., et Cifuentes, A. (2008). Ion-trap versus time-of-flight mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis to analyze biogenic amines in wine. *Journal of Chromatography A*, 1195(1): 150-156.

Soksawatmaekhin, W., Kuraishi, A., Sakata, K., Kashiwagi, K., et Igarashi, K. (2004). Excretion and uptake of cadaverine by *CadB* and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 51(5): 1401-412.

Soleas, G.J., Carey, M., et Goldberg, D.M. (1999). Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. *Food Chemistry*, 64(1): 49-58.

Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., et Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101(2): 704-716.

Standarová E., Vorlová, L., Kordiovská, P., Jantovšá, B., Dračková, M., et Borkovcová, I. (2010). Biogenic Amine Production in Olomouc Curd Cheese (Olomoucké tvarůžky) at Various Storage Conditions. *Acta Veterinaria Brno*, 79(1): 147-156.

Straub, B.W., Kicherer, M., Schilcher, S.M., et Hammes, W.P. (1995). The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 201(1): 79-82.

T

Tabor, C.W., et Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annual review of Biochemistry*, 53: 749-790.

Taylor, S.L., et Eitenmiller, R.R. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Critical reviews in toxicology*, 17(2): 91-128.

Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1): 73-84.

Terrade, N., et Mira de Orduña, R. (2006). Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2): 406-411.

Terrade, N., et Mira de Orduña, R. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1): 8-13.

Terrade, N., Noël, R., Couillaud, R., et Mira de Orduña, R. (2009). A new chemically defined medium for wine-lactic acid bacteria. *Food Research International*, 42: 363-367.

Tiburcio, A.F., Campos, J.L., Figueras, X., et Besford, R.T. (1993). Recent advances in the understanding of polyamines functions during plant development. *Plant Growth Regulation,* 12: 331-340.

Tkachenko, A.G., Pshenichnov, M.R., et Nesterova, L. (2001). Putrescine as a oxidative stress protecting factor in *Escherichia coli. Mikrobiologia*, 70: 487-494.

Tonon, T., Bourdineaud, J.P., et Lonvaud-Funel, A. (2001). Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspects énergétiques et génétiques. *Le Lait*, 81(1-2): 139-150.

Tonon, T., Bourdineaud, J-P., et Lonvaud-Funel, A. (2001). The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Research in Microbiology*, 152: 653-661.

Tonon, T., et Lonvaud-Funel, A. (2002). Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiology*, 19(5): 451-461.

Torrea, D., et Ancín, C. (2002). Content of biogenic amines in a chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17): 4895-4899.

U – V

Ulrike, E., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., et Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19): 7843-7853.

Vidal-Carou, M.C., Ambatlle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M.C., et Marine-Font, A. (1990). Histamine and tyramine in Spanish wines : their formation during the winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture,* 41(2): 160-167.

Vidal-Carou, M.C., Lahoz-Portolés, F., Bover-Cid, S., et Mariné-Font, A. (2003). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 998(1–2): 235-241.

Vigentini, I., Picozzi, C., Tirelli, A., Giugni, A., et Foschino, R. (2009). Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1): 123-128.

W – Z

Wolken, W.A.M., Lucas, P.M., Lonvaud-Funel, A., et Lolkema, J.S. (2006). The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*, 188(6): 2198-2206.

Yıldırım, H.K., Üren, A., et Yücel, U. (2007). Evaluation of biogenic amines in organic and non-organic wines by HPLC OPA derivatization. *Food Technology* and *Biotechnology*, 45(1): 62-68.

Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Wu, R., Chen, X., Chen, W., et Meng, H. (2010). Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in inner Mongolia, China. *Journal of Bacteriology*, 192(19): 5268-5269.

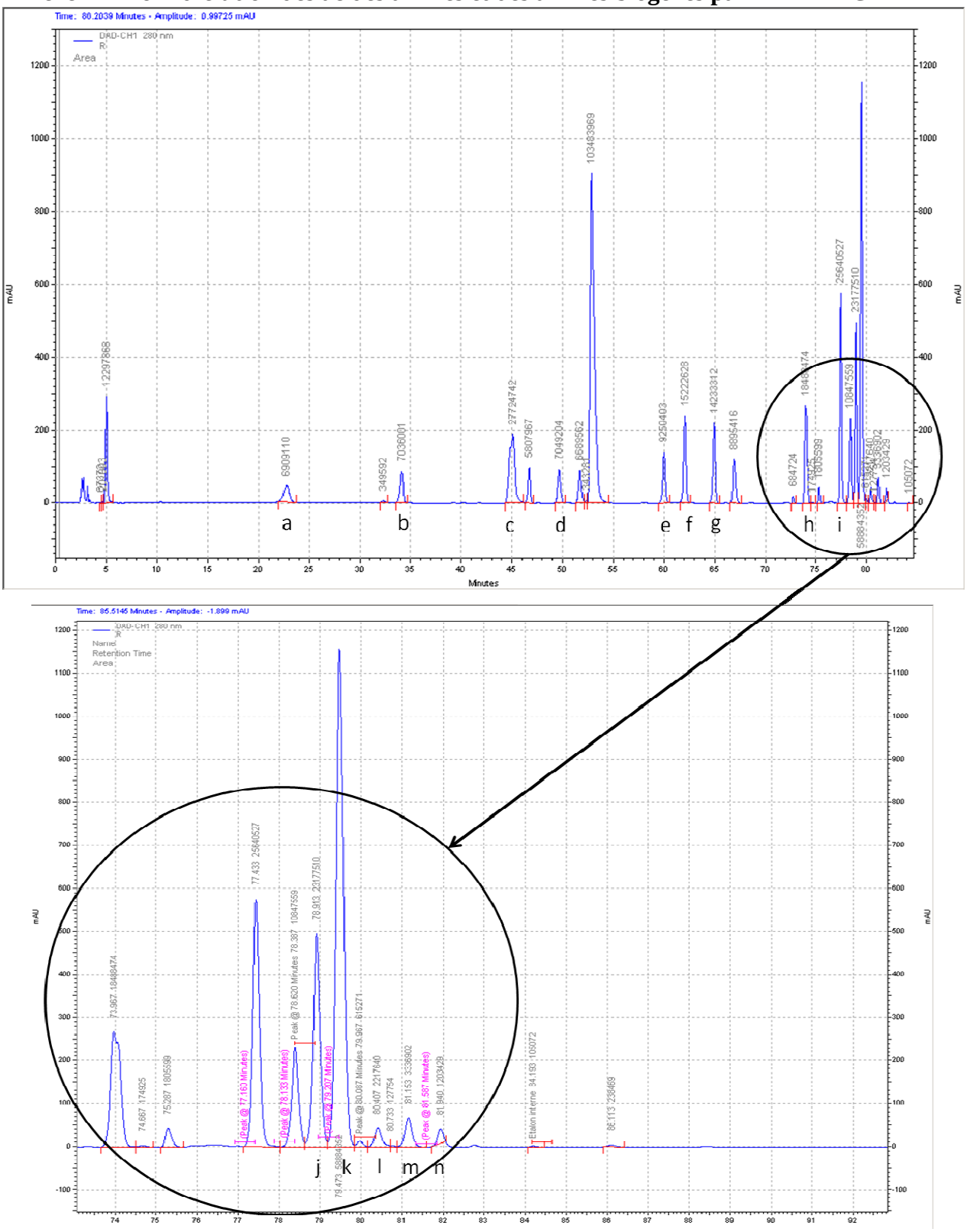
Zhong, J., Ye, X., Fang, Z., Xie, G., Liao, N., Shu, J., et Liu, D. (2012). Determination of biogenic amines in semi-dry and semi-sweet Chinese rice wines from the Shaoxing region. *Food Control*, 28: 151-156.

Annexes

Annexe 1 - Composition et préparation des solutions mères du milieu MCD

N° solutions mères	Concentration finale dans le milieu			Solution mère		Volume en (L) utilisé pour préparer 1 L de milieu MCD
	Composé	Concentration ($g.L^{-1}$)	Solubilité	Concentrée (x fois)	Concentration ($g.L^{-1}$)	
1	D-ribose	10	Eau	10	100	0,1
	$MnSO_4.4H_2O$	0,1		100	10	0,01
	$MgSO_4.7H_2O$	0,1		100	10	0,01
	K_2HPO_4	1		50	50	0,02
	$CaCl_2$	0,44		227	100	0,0044
	4-Aminobenzoic acid	0,0001		1000	0,1	0,001
	Choline Chloride	0,002		500	1	0,002
	Cyanocobalamine	0,0001		1000	0,1	0,001
	Nicotinic acid	0,002		500	1	0,002
	Ca-D-pantothenate	0,002		500	1	0,002
	Pyridoxine HCl	0,002		500	1	0,002
	$CuSO_4.5H_2O$	0,000015		667	0,01	0,0015
	$FeSO_4.7H_2O$	0,02		250	5	0,004
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,000135		1852	0,25	0,00054
2	Thiamine.Hcl	0,001	Eau	1000	1	0,001
	Adenine sulphate	0,01		100	1	0,01
	Cytosine	0,01		100	1	0,01
	Thymine	0,01		100	1	0,01
	Uracil	0,01		100	1	0,01
3	L-Alanine	0,2	Eau	50	10	0,02
	L-Glutamine	0,2		50	10	0,02
	L- Glycine	0,5		100	50	0,01
	L-Isoleucine	0,2		50	10	0,02
	L-Leucine	0,2		50	10	0,02
	L-lysine.2HCl	0,25		40	10	0,025
	L-Proline	0,5		20	10	0,05
	L-Serine	0,4		25	10	0,04
	L-Threonine	0,35		29	10	0,035
	L-Valine	0,2		50	10	0,02
4	Biotin	0,002	(50% 1M NaOH)	500	1	0,002
5	Xanthine	0,005	(10% 1M NaOH)	200	1	0,005
6	L-Arginine	0,75	Eau	13	10	0,075
7	Folic acid	0,002	(10% 1M HCl)	500	1	0,002
	Riboflavin	0,002	(10% 1M HCl)	500	1	0,002
	Guanine.HCl	0,01	(10% 1M HCl)	100	1	0,01
	L-Asparagine	0,15	HCl	67	10	0,015
	L-Aspartic acid	0,35	(2,5% 1M HCl)	11	4	0,0875
	L-Cysteine	0,2	(10% 1M HCl)	25	5	0,04
	L-Glutamic acid	0,5	(10% 1M HCl)	20	10	0,05
	L-Methionine	0,15	(10% 1M HCl)	33	5	0,03
8	L-Histidine	0,5	Eau	20	10	0,05
9	L-Phenyalanine	0,2	Eau	50	10	0,02
10	L-Tryptophan	0,2	NaOH	50	10	0,02
11	L-Tyrosine	0,2	(10% 1M NaOH)	25	5	0,04

Annexe 2 - Profil d'élution des acides aminés et des amines biogènes par RP- HPLC



Mélange de 14 solutions standard donnant les temps de rétention en minute en x ainsi que l'absorbance à 280 nm en y

a : L-histidine, b : L-tyrosine, c : histamine, d : agmatine, e : L-phénylalanine, f : L-ornithine, g : L-lysine, h : tyramine, i : putrescine, j : tryptamine, k : 2-phényléthylamine, l : cadavérine, m : spermidine, n : spermine.

Annexe 3 - Calcul de la quantité de sulfate d'ammonium à utiliser

L'ajout de sulfate dans les échantillons se fait sous forme de sulfate d'ammonium. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter est calculée en prenant en compte la concentration propre en sulfate dans les concentrations en sulfate d'agmatine désirée.

On a

- sulfate = 43% Agmatine sulfate
- sulfate = 73% sulfate d'ammonium
- Agmatine = 57% agmatine sulfate
- avec masse molaire sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ =132,14 $g.mol^{-1}$

Ainsi, la masse de sulfate ajoutée est calculée pour représenter exactement la même quantité présente dans le sulfate d'agmatine, afin de montrer un éventuel effet du sulfate, qui fausserait nos expériences.

Exemple de calcul pour une concentration à 30 $mg.L^{-1}$:

Concentration voulue de 30 $mg.L^{-1}$ d'agmatine soit 11,25 mg d'agmatine dans 375 mL. La masse d'agmatine sulfate à ajouter = 11,25 / 0,57= 19,74

a) Calcul de l'apport de sulfate par l'agmatine sulfate pour une concentration de 30mg/L :

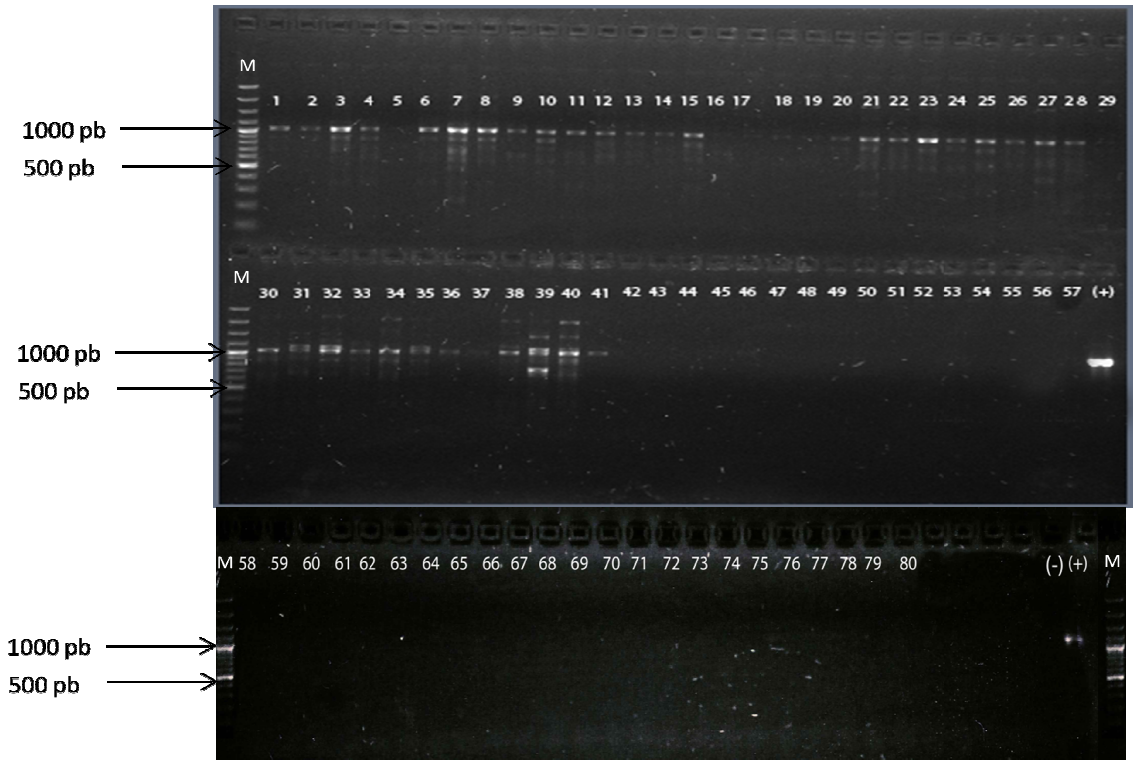
19,74 x 0,43 = 8,487 mg de sulfate

b) Calcul de la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter dans 375 ml de vin :

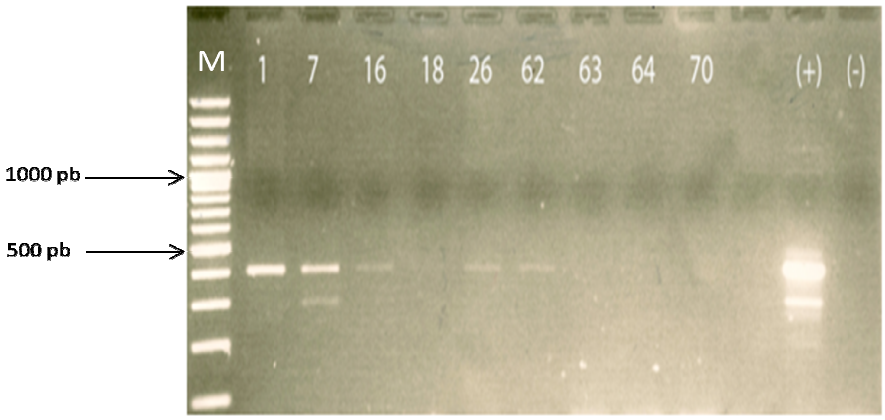
8,487 / 0,73= 11,63 mg de sulfate d'ammonium

Annexe 4 – Exemples de PCR obtenus pour les souches bactériennes isolées

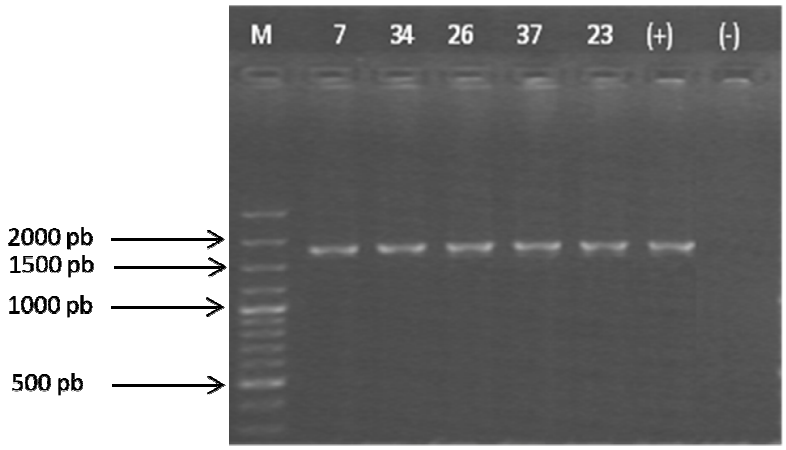
a) après amplification d'une partie du gène *tyrDC* (1133pb) codant pour la tyrosine décarboxylase, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, de 1 à 80 : les souches isolées, (-) : témoin négatif sans ADN, (+) : témoin positif (*Lactobacillus brevis* IOEB9809).



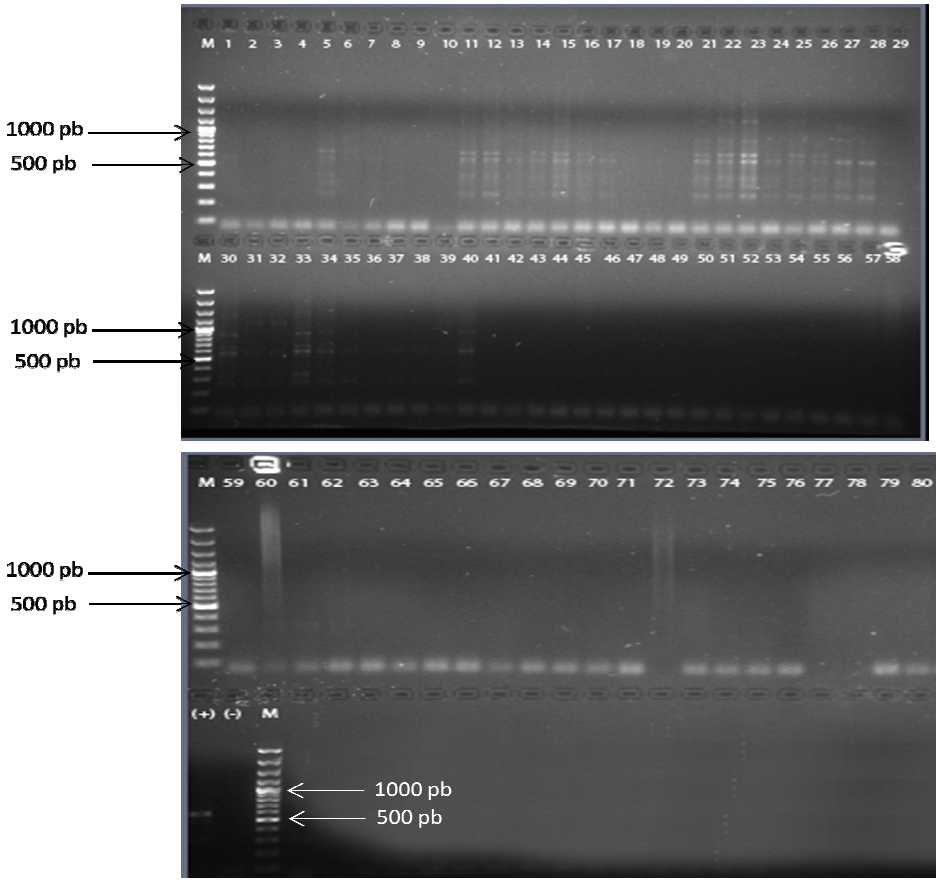
b) après amplification d'une partie du gène *hdcA* (402pb) codant pour la l'histidine décarboxylase, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, 1, 7, 16, 18, 26, 62, 63, 64, 70 : les souches isolées, (+) : témoin positif (*O. oeni* IOEB0610), (-) : témoin négatif sans ADN.



c) après amplification d'une partie du gène *odc* (1828pb) codant pour l'ornithine décarboxylase, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, 7, 34, 26, 37, 23 : les souches isolées, (+) : témoin positif (*O. oeni* BR1497), (-) : témoin négatif sans ADN.

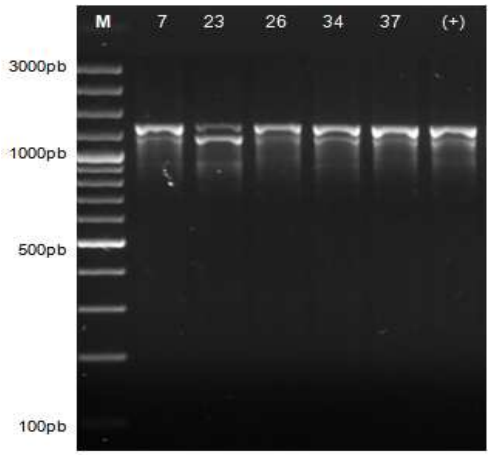


d) après amplification d'une partie du gène *agdi* (600 pb) codant pour l'agmatine déiminase, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, les souches testées (de 1 à 80), (+) : témoin positif (*Lactobacillus brevis IOEB9809*), (-) : témoin négatif sans ADN. Les bandes présentes dans la plupart des puits sont des hybridations aspécifiques.

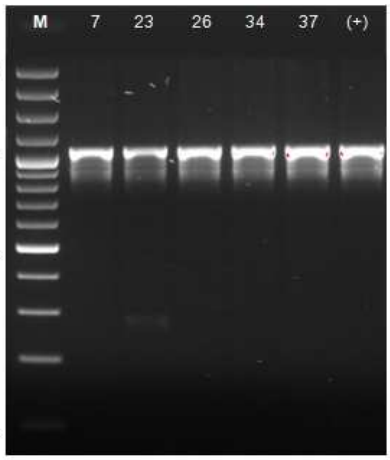


e) après amplification d'une partie des gènes : *arcA* (1247pb) (1), *arcB* (1050pb) (2), *arcC* (941pb) (3), *arcD1* (236pb) (4) et *arcD2* (588pb) (5), après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les puits de gauche à droite représentent : M : le marqueur de poids moléculaire de 100pb, **7, 34, 26, 34 et 37**: les souches isolées, (+) : témoin positif (*O. oeni* PSU1).

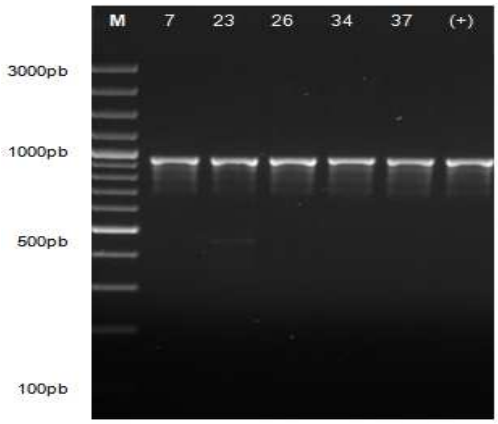
(1)



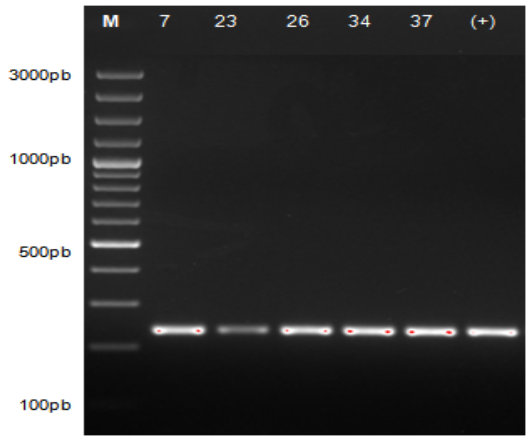
(2)



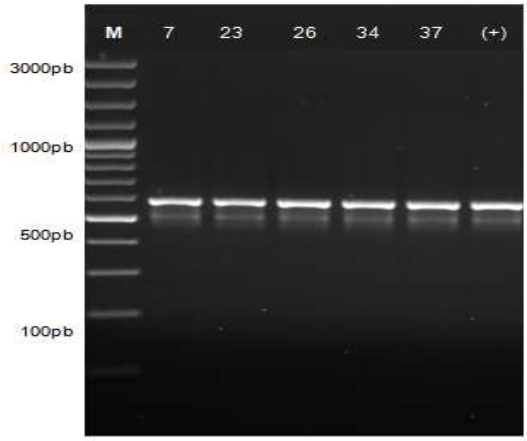
(3)



(4)



(5)



Annexe 5 - Profils d'utilisation des sucres de quelques souches isolées (Galerie API 50 CH, 4 jours)

	T	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
S7	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S34	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S26	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S37	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
S23	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : positif, - : négatif

0= Témoin ; 1= glycérol ; 2= Erythritol ; 3= D-arabinose ; 4= L-arabinose ; 5= D-ribose ; 6= Dxylose ; 7= L-xylose ; 8= D-adonitol ; 9= Méthyl-βD-xylopyranoside ; 10= D-galactose ; 11= D-glucose ; 12= D-fructose ; 13= D-mannose ; 14= L-sorbose ; 15= L-rhamnose ; 16= Dulcitol ; 17= Inositol ; 18= D-mannitol ; 19= D-sorbitol ; 20= Méthyl-αD-mannopyranoside ; 21= Méthyl-αD-glucopyranoside ; 22= N-acétylglucosamine ; 23= Amygdaline ; 24= Arbutine ; 25= Esculine ; 26= Salicine ; 27= D-cellobiose ; 28= D-maltose ; 29= D-lactose ; 30= D-mélibiose ; 31= D-saccharose ; 32= D-tréhalose ; 33= Inuline ; 34= D-mélézitose ; 35= D-raffinose ; 36= Amidon ; 37= Glycogène ; 38= Xylitol ; 39= Gentiobiose ; 40= D-turanose ; 41= D-lyxose ; 42= D-tagatose ; 43= D-fucose ; 44= L-fucose ; 45= D-arabitol ; 46= L-arabitol ; 47= Gluconate ; 48= 2-cétogluconate ; 49= 5-cétogluconate

Annexe 6 – Publication soumise à JIBM- (identifiant D-13-00131)

Amino-acid auxotrophies and biogenic amine production in *Oenococcus oeni*

Saïd Dandach, Vanessa David-Vaizant, Hervé Alexandre, Michèle Guilloux-Bénatier

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, UMR PAM Université de Bourgogne/AgroSup Dijon, Rue Claude Ladrey, BP27877- 21078 Dijon cedex, France

Corresponding author:michele.guilloux-benatier@u-bourgogne.fr, Phone: 00 33 380 396 957, Fax: 00 33 380 396 265, e-mail : michele.guilloux-benatier@u-bourgogne.fr

Abstract

Wine contains biogenic amines, which are produced principally by amino-acid decarboxylation by lactic acid bacteria. The concentration and nature of the biogenic amines present depend on the pH of the environment. Indeed, high pH leads to the production of a large biomass, but also results in considerable bacterial biodiversity. *Oenococcus oeni* has been identified as a potential producer of biogenic amines. This bacterium is auxotrophic for a number of amino acids. The relationship between auxotrophy for amino-acid precursors of biogenic amines (BA) and the BA concentration of the medium is unknown. We investigated this aspect in 80 isolates of *Oenococcus oeni* from red wines. We investigated the presence of genes encoding the various decarboxylases responsible for BA synthesis in these strains, which we also characterized in terms of their auxotrophy for the four amino-acid precursors of BA (Arg, Tyr, His, Phe). There was no direct correlation between the presence of decarboxylase genes and the accumulation of the corresponding BA. Furthermore, no link was found between auxotrophy for an amino acid and the accumulation of the corresponding BA. We report here, for the first time, the production of large amounts of agmatine (120 mg/l) due to arginine decarboxylation by *Oenococcus oeni*. Agmatine production was isolate-dependent but, in our conditions, larger amounts of this compound were produced at pH 5.3 than at pH 4.0, for an equivalent biomass. Agmatine is produced principally at the end of the exponential growth phase, and its levels are correlated with arginine decarboxylase activity. Only one of the isolates tested (cluster arc^+, odc^+) produced putrescine via the arginine deiminase pathway, because this strain did not possess the agmatine deiminase gene.

Keywords: Wine *Oenococcus oeni*- auxotrophy - amine production -agmatine

Introduction

Biogenic amines (BA) are low-molecular weight organic bases generated by metabolic activity in animals, plants and microorganisms. They are formed principally by the enzyme-catalyzed decarboxylation of amino acids and they have many physiological functions. They are involved in brain activity, body temperature regulation, gastric acid secretion, immune system responses, blood pressure regulation, cell growth and differentiation [1]. Excessive BA consumption

can cause various symptoms, such as headache, diarrhea, respiratory distress, tachycardia and blood pressure disorders following the consumption of foods containing histamine, and headaches, migraine, neurological disorders, nausea, vomiting, respiratory disorders and hypertension in cases of tyramine consumption [2]. Some BA (putrescine, cadaverine, spermidine and spermine) are potential precursors of carcinogenic nitrosamines [3].

Several studies have investigated the formation of BA in wine. The most abundant BA in wines are putrescine, histamine, tyramine, cadaverine and phenylethylamine [4]. Some of these amines, such as putrescine and spermidine, are present in small amounts in the raw material [5]. BA may be formed by yeasts during the alcoholic fermentation [6], but they are generated principally by lactic acid bacteria (LAB) during malolactic fermentation (MLF) [7]. The formation of BA in wine is influenced by many factors, including grape variety, soil type and the geographic location of the vineyard [8, 9]. The winemaking process itself also has a major effect on the amount of BA formed in the wine [10, 11]. The physicochemical properties of the wine, the degree of alcohol and temperature in particular may affect the BA content of the wine. However, pH is the main factor influencing BA production. Indeed, high pH favors the development of a great diversity of lactic acid bacteria and the production of a large amount of biomass [7]. However, the principal bacteria responsible for producing BA such as tyramine, putrescine and histamine belong to the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* [12]. *Oenococcus oeni* is the principal bacterium responsible for MLF in wines. This bacterium produces BA, but generally in very small, possibly even negligible, amounts [13]. However, the production of substantial amounts of histamine, putrescine and cadaverine by *O. oeni* has been reported in some studies [14, 15].

The physiological role of BA production remains a matter of debate. Molenaar et al. [16] showed that the decarboxylation of histidine to histamine in *Lactobacillus buchneri* was involved in the generation of metabolic energy and resistance to acid stress. Another study showed that the formation of tyramine from tyrosine in *Lactobacillus brevis* contributed to the acid stress resistance of this species [17]. However, other studies have shown that BA content does not increase with acidity [18, 19]. BA synthesis in wine is dependent on the concentration of amino-acid precursors present [20, 21], although it has proved difficult to establish a relationship between the concentration of a free amino acid and the formation of the corresponding amine [22]. *Oenococcus oeni* does not require large amounts of nitrogen, but its requirements are complex, with a need for both amino acids and peptides [23]. *O. oeni* is auxotrophic for 7 to 13 amino acids, depending on the strain concerned [24]. Even if an amino acid is not essential, it may appear to be so [24, 25, 26]. Amino-acid transport is coupled to the export of the corresponding amine following the decarboxylation of the amino acid. This generates a protonmotive force constituted by the membrane potential and a transmembrane pH gradient, generating energy and protecting the cells against the adverse effects of the acid environment during nutritional depletion [18]. In this study, our main aim was to explore BA

production by *O. oeni* isolates from different French wines, to determine whether isolates auxotrophic for a particular amino-acid precursor of amines produce more BA then non auxotrophic isolates when the amino acid is present in the medium. However, some of the amino acids required for bacterial growth are precursors of biogenic amines and may therefore affect amine production.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Acetonitrile and methanol (HPLC - grade) were obtained from CarloErba Reagents (Val de Reuil, France). Amines and amino acids were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and had purity greater than 98%. Deionized water was obtained with the milli-Q system (Millipore, Bedford, USA). Other chemicals, diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) and boric acid were purchased from Sigma-Aldrich.

Bacterial strains and culture conditions

In total, 80 indigenous lactic acid bacteria were isolated at the end of the MLF. All these isolates were obtained from three red wines (grapes harvested in 2009) originating from three areas of France: Côtes du Rhône, Bordeaux and Burgundy. Samples were diluted 1 in 2, with 0.9 ‰ NaCl. The bacteria were then allowed to grow on LAC medium (pH5.3) supplemented with 20 g/l agar. LAC medium is a basal medium with the following composition: 33 g/l yeast extract; 0.6 ml/l Tween 80; 0.08 g/l $MnSO_4.H_2O$ and78 ml/l white grape juice. This medium was sterilized (20 min at 120°C) and allowed to cool to 50 to 55°C), at which point, we added 5 ml of the antifungal compound Delvocid (1% w/v) (Gist Brocades, Seclin, France). Cultures in jars (Oxoid, France) were then incubated in anaerobic conditions, at 28°C, for 7 to 10 days. We isolated 80 colonies at random. The purified indigenous bacterial isolates were maintained at -80°C, in 40% glycerol.

Isolate identification

Isolates were identified with the API 50 CH identification system (BioMérieux, France). The FT80 medium [27] was modified by eliminating D,L-malic acid and sugars (glucose and fructose). Its composition was thus as follows: 5 g/l meat extract; 5 g/l yeast extract; 0.6 g/l KH_2PO_4; 0.45 g/l KCl; 0.13 g/l $CaCl_2.2H_2O$; 3 mg/l $MnSO_4$; 0.13g/l $MgSO_4.7H_2O$ and 1 ml/l Tween 80. Isolate identification was confirmed by amplified ribosomal DNA restriction analysis (16S-ARDRA) [28]. The following primers were used for molecular characterization: pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and pH (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). Amplification reactions were performed in a final volume of 50 µl, containing 10 µl GoTaq® Flexi DNA buffer (5 X) (Promega) with 2 mM $MgCl_2$, 0.2 Mm dNTP mixture, 1 µM of each primer, 0.05 U/µl *Taq* polymerase (Promega) and 1 to 2 ng/µl template

DNA. Amplifications were carried out in a Thermocycler (Biorad) with the following program: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of,94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 60 seconds and a final extension phase of 5 min at 72°C. Restriction analysis was carried out with *Mse*I. Each 16S rDNA amplicon (10 µl) was digested with 1 µl of *Mse*I (10,000 U/ml), in 2 µl of the corresponding enzyme buffer in a final volume of 20 µl, with incubation for 16 h at 37°C. The DNA restriction fragments were analyzed by electrophoresis in a 2% (w/v) agarose gel, with ethidium bromide staining and visualization of the bands under UV illumination. All of the isolates were identified as *O. oeni*.

PCR-based search forgenes involved in biogenic amine production

We screened 80 bacterial isolates for the presence of genes encoding proteins involved in the production of biogenic amines (histamine, tyramine and putrescine). We did not investigate the possible presence of genes encoding proteins involved in phenylethylamine production, due to the lack of availability of data concerning these genes. The primer pairs used have been described elsewhere: HDCA F/HDCA R [29] and TD2/TD5 [30] for partial amplification of the *hdcA* gene (histidine decarboxylase) and the *tyrdc* gene (tyrosine decarboxylase), respectively, and ODC V1/ODC V3 [29] for partial amplification of the *odc* gene (ornithine decarboxylase). We also tested for the presence of the cluster *arc* (arginine deiminase pathway) and *agdi* (agmatine deiminase) gene, using the ADIOO5'/ADIOO3', OTCOO F/ OTCOO R, CKOO5'/CKOO3', B11/B12bis, B5/B6 [31] primers for partial amplifications of arginine deiminase, ornithine transcarbamylase, carbamate kinase, arginine/ornthine antiport, respectively and AgD1/AgD2 [32] primers for partial amplication of agmatine deiminase. For the primers sets TD2 and TD5, the program was as follows: 94°C 3 min, 30 cycles of 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min 15 s with a final extension at 72°C 15 min. For the primers sets HDCA F and HDCA R, the program was as follows: 94°C 3 min, 30 cycles of 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s with a final extension at 72°C 15 min. For the primers sets ODC V1 and ODC V3, the program was as follows: 94°C 3 min, 30 cycles of 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 3 min with a final extension at 72°C 15 min. For the primers sets OTCOO F and OTCOO R, ADIOO F and ADIOO R, CKOO F and CKOO R, B11 F and B12 bis, B5 F and B6, the program was as follows: 94°C 3 min, 35 cycles of 94°C 30 s, 45°C 30 s, 72°C 1 min 30 s with a final extension at 72°C 15 min. . For the primers sets AgD1 and AgD2, the program was as follows: 94°C 3 min, 30 cycles of 94°C 30 s, 56°C 45 s, 72°C 45 s with a final extension at 72°C 15 min. Amplification reactions were performed in a final volume of 24 µl containing 5 µl of GoTaq® Flexi DNA buffer (5 x; Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 Mm dNTP mix, 1 µM of each primer, 0.04 U/µl *Taq* polymerase (Promega) and 2.1 to 4.2 ng/µl template DNA. All multiplex experiments were carried out in a Mastercycler Gradient (Bio-Rad) with*Taq* polymerase (Promega). For PCR experiments, we analyzed

2µl of each PCR sample by electrophoresis in a 2% (w/v) agarose gel in 1 x TAE buffer at 105 V for 60 min, with ethidium bromide staining for visualization. A positive control isolate was included in each set of experiments.

Amino-acid auxotrophies of *O. oeni* strains

Amino-acid auxotrophies were investigated in a chemically defined medium (CDM) from which we omitted each of the amino acids of interest (arginine, histidine, phenylalanine and tyrosine) in turn. These four amino acids have all been shown to be important for bacterial growth [24].This medium was similar to that used by Terrade and Mira de Orduña [33] and is suitable for investigations of the nutritional requirements and metabolism of lactic acid bacteria in wine. Isolates were first grown to the mid-exponential growth phase in LAC medium. The cells were collected by centrifugation (5000 x *g*, 10 min, 4°C), washed twice and transferred to CDM medium. The two washes ensured that any growth observed was due exclusively to nutrients from CDM medium. All transfers occurred at an inoculation rate of 5% (v/v) and for each growth experiment. All growth studies were carried out in triplicate. A non inoculated control was also established, to check the sterility of each batch of medium, and complete CDM medium (without amino acid omission) was used as a control medium. All cultures were carried out in 5 ml plastic tubes incubated at 28°C, to establish anaerobic conditions. Growth was monitored by measuring the absorbance at 600 nm, and we calculated the percentage of biomass obtained relative to that obtained in complete medium.

Biogenic amine production

Isolates were grown in CDM medium at pH 4 and pH 5.3. The BA released from the strains investigated were quantified by RP-HPLC with 2,4,6-trimethyl hydrochloride as an internal standard, as previously described [29]. The method involved the pre-column derivatization of the amines by treatment with diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) on an HPLC column (C18-HL) (Grace, Alltech) with 5 µm particles (250 mm x 4.6 mm),maintained at 16°C with a thermostat throughout the binary gradient (phase A, 25 mM acetate buffer pH 5.8 with 0.02% sodium azide; phase B, 80:20 mixture of acetonitrile and methanol), and run at a flow rate 0.9 ml/min. Detection at 280 nm made it possible to separate, identify and quantify all the compounds from a single injection. Compounds were identified on the basis of retention time and quantified by the internal standard method.

Arginine decarboxylase activity assay

Cells were collected by centrifugation (7 000 x *g*, 15 min, 4°C) at various points in their growth cycle in LAC media (pH 5.3) and washed twice in 0.9‰ NaCl. The biomass was resuspended in 10 ml of 50 mM MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) pH 5.6. The cells were disrupted (3 x 0.8 kb) witha high-pressure disruption system (Constant, United Kingdom). The temperature was kept low because the high-pressure used induces warming and high temperatures may denature proteins. Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at (14,000 x*g*, 10

min, 4°C). Protein concentration was determined by the Bradford method. Arginine decarboxylase activity was assessed by measuring the release of agmatine from arginine by the RP-HPLC method described above. Assays were conducted in a reaction volume of 5 ml, with a protocol based on that of Moreno-Arribas and Lonvaud-Funel [34]. The reaction mixture contained 3.6 mM arginine,25 mg/l BSA, 2.5 ml of cell supernatant and 0.5 µM pyridoxal-5P-phosphate in 2.5 ml of 0.5 M citrate-phosphate buffer. Experiments were conducted at 35°C for three hours and the reaction was started by adding the amino acid to the reaction mixture.

Results and discussion

Genes involved in biogenic amine production

PCR assays were performed to detect the presence of genes encoding enzymes involved in tyramine, histamine and putrescine synthesis in our isolates from wine. We tested for the *tyrdc* gene encoding tyrosine decarboxylase, which catalyzes tyramine formation and the *hdcA* gene encoding histidine decarboxylase, which catalyzes histamine formation. According to Landete et al. [35], several genes are involved in the synthesis of putrescine. The arginine deiminase (ADI) pathway contains three enzymes: arginine deiminase (encoded by *arcA*),which converts arginine into citrulline, ornithine transcarbamoylase (encoded by *arcB*), which converts citrulline into ornithine and carbamyl-Pi, and carbamate kinase (encoded by *arcC*), which transforms carbamyl-Pi into NH_3^+, CO_2 and ATP. Ornithine is then converted into putrescine by ornithine decarboxylase (gene *odc*). Lactic acid bacteria can decarboxylate arginine to produce agmatine, with putrescine subsequently formed by the agmatine deiminase pathway (gene *agdi*). We therefore investigated the *odc*, *arcA*, *arcB*, *arcC*, *arcD1*, *arcD2* and *agdi* genes in the strains (Table 1).

Primers targeting the tyrosine decarboxylase gene are already available, and many attempts to screen lactic acid bacteria for tyramine production have therefore been reported [36]. This gene is often encountered in *L. hilgardii* and *L. brevis*, less frequently in *L. plantarum* [32, 37, 38] and rarely in *O. oeni* [32, 39, 40]. Some studies have reported that *O. Oeni* cannot produce tyramine [13, 14], whereas others have demonstrated the production of this molecule, by this species, in wine [18, 41]. We found that 41% of the isolates harbored the *tyrdc* gene.

Only 6% of the isolated strains possessed the *hdc* gene. These results are consistent with those of Coton et al. [32], who detected this gene in 10 of 113 *O. Oeni* isolates from wine. However, discrepancies have been reported. Landete et al. [4] detected the histidine decarboxylase gene in 24 of 32 *O. oeni* isolates from Spanish wines. Similar observations were reported by Lonvaud-Funel [7]: 49% of the French wines analyzed contained hdc^+ bacteria from the species *O. oeni*. By contrast, not all the *O. Oeni* isolates obtained from South African wines [39], Spanish wines [40] and Greek wines [42] carry the histidine decarboxylase gene. Garcia-Moruno and Munoz [43] recently tried to clarify these contradictory results. According to these authors, *O. oeni* is not responsible for histamine production in

wine. Indeed, the *hdc* gene is not common in *O. oeni* and most strains do not possess the *hdc* cluster gene. These discrepancies may be accounted for by the presence of the *hdc* gene on a large, possibly unstable plasmid of about 100 kb [37]. Many *O. oeni* strains may lose this plasmid during subculture.

Only 19% of tested isolates were odc^+, confirming the low frequency of the *odc* gene in *O. oeni* isolates: 28 of 121 isolates from Portuguese wines [11], seven of 60 isolates from Greek wines [42] and two of 113 isolates in another study [32] were odc^+. In a recent screening of 263 isolates from two different matrices, wine and cider, the presence or absence of the *odc* gene was found to be highly strain dependent [29]. Only five of the 263 strains were odc^+. The presence of the *odc* gene seems to be correlated with the production of putrescine. Seven of the 44 odc^+ isolates tested in one study were found to produce putrescine [14].

The entire cluster *arc* was found in all five isolates tested (Table 2).Previous studies have shown that the presence of the *arcABCD* gene cluster is strain-dependent [31]. None of the isolates tested appeared to have the *agdi* gene. This confirms the findings of previous studies [44] suggesting that this gene was not present in *O. oeni*. However, Coton et al. [32] recently obtained *O. oeni* isolates that were $agdi^+$, but they were all isolated from cider.All the wine isolates were $agdi^-$. Indeed, wine strains producing putrescine do so through the arginine deiminase pathway, with subsequent ornithine decarboxylase action, rather than via the agmatine deiminase pathway. Our findings confirm that *O. oeni* may possess several genes encoding decarboxylases involved in BA synthesis (Table 2). Indeed, the five isolates studied possessed both the cluster *arc* and *odc* genes, and would therefore be expected to produce putrescine from arginine. *O. oeni* may be cluster arc^+, odc^+, cluster arc^-/odc^+ or cluster arc^+/odc^- [14].

Characterization of auxotrophy

Auxotrophy was assessed in a chemically defined medium at pH 5.3, with at least three replicates for each isolate. We carried out our studies at a pH of 5.3, because all previous studies on the amino-acid requirements of *O. oeni* were performed at pH values of between 4.8 and 5.3, allowing a high level of bacterial growth [24, 25, 26]. CDM contains 44 compounds: carbon sources, mineral salts, nitrogen sources from amino acids, nucleotides and vitamins. According to Terrade et al. [33], this medium gives the best growth of lactic acid bacteria transferred from collection sites to the laboratory for analysis. However, in our study, only a small number of the tested isolates were able to grow in this medium. CDM may not be the best medium for the development of indigenous *O. oeni* strains. All isolates were able to grow in LAC media. However, several major isolates were more difficult to grow than others in CDM. These isolates were not retained for subsequent studies because they did not grow enough (A_{600nm}< 0.3) for auxotrophy test. The isolates that grew sufficiently in CDM for tested were isolates 7, 23, 26, 34 and 37, with maximal absorbances after incubation at 28°C of 1.24, 0.33, 1.57, 0.44 and 0.33.

Auxotrophy tests involve the omission of a single amino acid from the medium. An amino acid omitted from the CDM medium was considered i) essential (E) if the biomass formed was less than 25% that of the control culture (without amino acid omission), ii) stimulating (S) if the biomass formed corresponded to25 to 80% that of the control culture and iii) not essential (NE) if the biomass formed corresponded to more than 80% that obtained with thecontrol. The results of the auxotrophy tests are shown in Figure 1. Data are expressed as percentages of control values. Growth yield varied considerably between replicates for some strains and some amino acids.Similar findings were reported by Remize et al. [24]. This effect is shown indicated on the graphs by the significant standard deviations, for histidine omission for isolates 34, 26 and 37, tyrosine omission for isolate26, phenylalanine omission for isolate26 and arginine omission for isolate37. *O. oeni* has a very low nitrogen requirement [23], and the residual amino-acid content of cells is therefore sufficient to promote microbial growth. The preculture medium (LAC) is rich in nitrogen, but contamination was prevented by washing the cells twice in dilute saline and the centrifuging them to eliminate any residual medium before incorporation into CDM. Isolate 23 was the most demanding of the five isolates tested, because all four amino acids tested were considered essential for its growth. Other isolates were auxotrophic for only one or two amino acids: isolates7, 34 and 26 were auxotrophic for arginine, strain 34 was auxotrophic for tyrosine and strain 37 was auxotrophic for phenylalanine. The omission of one of the four amino acids studied led to a highly significant effect, resulting in a lower biomass.

The potential of selected strains to produce biogenic amines

BA production was assessed in CDM at two pH values (4 and 5.3). The pH values used were relatively high, to promote the use of amino acids and the eventual production of biogenic amines [18, 45]. Indeed, arginine does not seem to be used at low pH [46], although this feature is strain-dependent [47]. At the end of the exponential growth phase, BA production was assessed by RP-HPLC (Table 3). The amino-acid precursors required for BA production were present in the medium (e.g. lysine for cadaverine, trytophan for trytamine), but only three amines were detected, with agmatine being produced in the largest amounts by all five *O. oeni* isolates tested.

Isolates7 and 26 were *hdc*$^{+}$, but neither of these isolates released any histamine into the medium, at either of the pH values tested. The absence of histamine production by isolates 23, 34 and 37 may be accounted for by the absence of an *hdc* gene in these strains. However, our results clearly indicate that the presence of the gene is not necessarily sufficient for histamine synthesis to occur. Thus, the detection of BA producers with molecular probes, as previously reported [7, 48] might result in false positives. Indeed, the presence of the gene is not always associated with BA production [41].

Isolates7, 26, 23 and 34 were all *tyr*$^{+}$, but no tyramine release into the medium was detected. Moreover, isolate 34 was the only one of the isolates tested to produce small amounts of phenylethylamine (0.3-0.6 mg/l). These findings suggest that *O. oeni* does not generally produce tyramine and phenylethylamine. Guerrini et al. [14] reported a lack of significant tyramine and phenylethylamine release into the growth medium after inoculation with 44 different *O. oeni* strains. The simultaneous production of tyramine and phenylethylamine by lactic acid bacteria, such as *L. brevis* and *L. hilgardii,* has been observed. These species are generally strong producers of tyramine, but isolates producing low levels of tyramine do not synthesize phenylethylamine [49].

All the isolates were *arcABCD*$^{+}$ and *odc*$^{+}$ and were therefore potentially able to produce putrescine via ornithine, but this amine was produced only by isolate 26, at pH 5.3, and even then only at a very low level (0.4 mg/l). However isolates 4 and 5 synthesized large amounts of agmatine, ranging from 60 to 120 mg/l. Some *Lactobacillus hilgardii* strains have been reported to produce agmatine and to generate putrescine from agmatine [50]. We report here, for the first time, the production of agmatine by *O. oeni*. Agmatine is not usually analyzed in studies of BA production by *O. oeni*, particularly in wine. Some rare studies have reported agmatine levels of up to 20 mg.l^{-1} [22, 51]. As *O. oeni* is the principal bacterial species involved in malolactic fermentation, agmatine quantification maybe useful. Moreover, the impact of agmatine on the sensorial properties of the wine should be investigated further.

The contribution of the ADI pathway to general competitiveness and adaptation to the environment is well known. This contribution is strain- and pH-dependent, but the highest levels of *arc* operon expression are often observed at the optimal pH for growth in *L. sakei* [52]. The decarboxylation of arginine to generate agmatine may also have an impact on the pH of the medium, due to the loss of an acid group. However, we found levels of agmatine production to be greater at pH 5.3, which is the optimal growth pH of *O. oeni*, than at pH 4. For the four isolates found to produce agmatine, the amounts produced, in mg/l/unit $A_{600\ nm}$ at pH 5.3 and pH 4 were 150 and 52, respectively, for isolate 7, 82 and 39 for isolate34, 102 and 24 for isolate26, and 133 and 0.2 for isolate 23. Further investigations are therefore required to determine the impact of this arginine utilization pathway in *O. oeni* strains.

Our isolates were unable to produce putrescine from agmatine via the agmatine deiminase pathway, because they were all *agdi*$^{-}$. We determined the fate of arginine, which can be metabolized by either the arginine decarboxylase or arginine deiminase pathway, by quantifying the intermediates produced by these two pathways in a cellular extract (Table 4).

Both pathways appeared to be used in isolate 7, and the amounts of ornithine (arginine deiminase pathway) and agmatine (arginine decarboxylase pathway) produced were similar. By contrast, isolate 34 produced twice as much agmatine as ornithine, reflecting the preferential use of the arginine decarboxylase pathway. Neither of these isolates

produced putrescine from ornithine, despite having the *odc* gene in their genomes. In the presence of arginine, these isolates accumulated agmatine, confirming that they had no agmatine deiminase gene in their genome. Small amounts of citrulline (an intermediate) are excreted during arginine catabolism. The presence of this amino acid might thus allow the formation of ethylcarbamate in media containing ethanol, such as wine. The reasons for the differences in arginine metabolism by these two strains are unclear and require further investigation.

Arginine decarboxylase activity was determined at the start and end of the exponential growth phase. Arginine decarboxylase activity levels were below 50 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ protein in both isolates, but increased to 300 and 120 $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$ protein for isolates 7 and 34, respectively, at the end of the exponential growth phase. This increase may reflect a stress response mechanism [53] leading to the production of ATP and $NH_3$and facilitating additional energy and pH regulation of the medium during the late exponential growth or stationary phases [46].

Finally, we investigated the relationships between amino-acid auxotrophy, the presence genes encoding the enzymes required for BA synthesis and the level of the corresponding amine in the medium.

It was not possible to draw firm conclusions for histidine and phenylalanine. Isolate 23 was auxotrophic for histidine but did not have the *hdc* gene. Isolates 7 and 26, which possess the *hdc* gene, were not auxotrophic for histidine and did not synthesize histamine. Tyrosine auxotrophy in the tyr^+ isolates 23 and 34 did not result in higher levels of tyramine production than in the non auxotrophic tyr^+ isolates7 and 26. The four isolates auxotrophic for arginine produced more agmatine than the non auxotrophic isolate 37, but only at pH 5.3, not at pH 4. Thus, there is no clear relationship between auxotrophies for amino-acid precursors of BA and BA production. This is interesting from a technical point of view, because *O. oeni*, the main agent involved in malolactic fermentation, is auxotrophic for a number of amino acids. However, unambiguous demonstration of the lack of correlation between auxotrophy and BA production will require the use of strains with identical genetic backgrounds. A wild-type strain and a mutant of that strain auxotrophic for a particular amino-acid precursor of BA should be compared. However, no genetic tools for the deletion of sequences in *O. oeni* are currently available.

Conclusion

Thus, auxotrophy for an amino-acid precursor of a biogenic amine does not necessarily lead to the synthesis of the biogenic amine following the addition of the amino acid concerned to the culture medium. Likewise, the presence of a gene involved in biogenic amine synthesis does not necessarily imply that the strain concerned will produce the corresponding biogenic amine. None of the isolates studied here possessed the full agmatine deiminase pathway, but all had arginine decarboxylase activity. Agmatine was the principal biogenic amine produced by the five isolates studied. Thus, *O. oeni* appears to be a potential source of agmatine in wine.

References

1. Shalaby AR (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res Int 29:675-690.
2. Ladero V, Calles-Enríquez M, Fernández M, Alvarez MA (2010) Toxicological effects of dietary biogenic amines. Curr Nutr Food SciCurrent 6:145-156.
3. Karovicova J, Kohajdova Z (2005) Review : Biogenic Amines in Food. Chem Pap 59:70-79.
4. Landete JM, Ferrer S, Polo L, Pardo I (2005) Biogenic amines in wines from three Spanish regions. J Agric Food Chem 53:1119-1124.
5. Bauza T, Kelly MT Blaise A (2007) Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. Food Chem 105:405-413.
6. Caruso M, Fiore C, Contursi M, Salzano G, Paparella A, Romano P (2002) Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. World J Microbiol Biotechnol 18:159-163.
7. Lonvaud-Funel A (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 199:9-13.
8. Soleas GJ, Carey M, Goldberg DM (1999) Method development and cultivarrelated differences of nine biogenic amines in Ontario wines. Food Chem 64:49-58.
9. Soufleros EH, Bouloumpasi E, Zotou A, Loukou Z (2007) Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. Food Chem 101: 704-716.
10. Martín-Álvarez PJ, Marcobal Á, Polo C, Moreno-Arribas MV (2006) Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. Eur Food Res Technol 222: 420-424.
11. Marques AP, Leitão MC, San Romão MV (2008) Biogenic amines in wines: influence of oenological factors. Food Chem 107: 853-860.
12. Landete JM, Ferrer S, Pardo I (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine ? J Appl Microbiol 99:580-586.
13. Moreno-Arribas M, Carmen Polo M, Jorganes F, Muñoz R (2003) Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Int J Food Microbiol 84:117-123.
14. Guerrini S, Mangani S, Granchi L, Vincenzini M (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. Cur Microbiol 44:374-378.
15. Rosi I, Nannelli F, Giovani G (2009) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Sci Technol 42:525-530.

16. Molenaar D, Bosscher JS, Ten Brink B, Driessen AJ, Konings WN (1993) Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. J Bacteriol 175:2864-2870.

17. Wolken WAM, Lucas PM, Lonvaud-Funel A, Lolkema JS (2006) The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. J Bacteriol 188:2198-2206.

18. Gardini F, Zaccarelli A, Belletti N, Faustini F, Cavazza A, Martuscelli M, Mastrocola D, Suzzi G (2005) Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. Food Control 16:609-616.

19. Proestos C, Loukatos P, Komaitis M (2008) Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. Food Chem 106:1218-1224.

20. Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O, Alves A (2005) Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. J Food Eng 66:315-322.

21. Moreno-Arribas M, Polo CM (2008) Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. Food Microbiol 25:875-881.

22. Bauza T, Blaise A, Teisseidre PL, Mestres JP, Daumas F, Cabanis JC (1995b) Evolution des teneurs en amines biogènes des moûts et des vins. Sci Aliments 15:559-570 ;

23. Guilloux-Benatier M, Remize F, Gal L, Guzzo J, Alexandre H (2006). Effects of yeast proteolytic activity on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. FEMS Microbiol Lett 263:183-188.

24. Remize F, Gaudin A, Kong Y, Guzzo J, Alexandre H, Krieger S, Guilloux-Benatier M (2006) *Oenococcus oeni* preference for peptides : qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. Arch Microbiol 185:459-469.

25. Fourcassie P, Makaga-Kabinda-Massard E, Belarbi A, Maujean A (1992) Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc œnos* strains in 18 media deficient in one amino acid. J Appl Microbiol 73:489-496.

26. Saguir FM, Manca de Nadra MC (2002) Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. J Appl Microbiol 93:295-301.

27. Cavin JF, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Divies C (1989) Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. Appl Environ Microbiol 55:751-753.

28. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2003) 16s-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. Syst Appl Microbiol 26:412-422.

29. Bonnin-Jusserand M (2011) Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. PhD thesis, Université de Bourgogne.

30. Coton E, Coton M (2005) Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine-and tyramine producing bacteria. J Microbiol Methods 63:296-304.

31. Divol B, Tonon T, Morichon S, Gindreau E, Lonvaud-Funel A (2003) Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. J Appl Microbiol 94:738-746.

32. Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Coton E (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. Food Microbiol 27:1078-1085.

33. Terrade N, Noël R, Couillaud R, Mira de Orduña R (2009) A new chemically defined medium for wine-lactic acid bacteria. Food Res Int 42:363-367.

34. Moreno-Arribas V, Lonvaud-Funel A (1999) Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. FEMS Microbiol Lett 180:55-60.

35. Landete JM, Arena ME, Pardo I, Manca de Nadra MC, Ferrer S (2010) The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *Int Microbiol* 13:16-177.

36. Coton M, Coton E, Lucas P, Lonvaud A (2004) Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. Food Microbiol 21:125-130.

37. Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2008) High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. Appl Environ Microbiol 3:811-817.

38. Arena ME, Landete JM, Manca de Nadra MC, Pardo I, Ferrer S (2007) Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X1B isolated from wine. J Appl Microbiol 105:158-165.

39. Lerm E, Engelbrecht L, Du Toit M (2011) Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. S Afr J Enol Vitic 32: 280-295.

40. Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, Palop ML (2010) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). Appl Microbiol Biotechnol 86:1555-1562.

41. Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, De Revel G, Lonvaud-Funel A, Lucas PM (2008) Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. Lett Appl Microbiol 47:594-599.

42. Pramateftaki PV, Metafa M, Karapetrou G, Marmaras G (2012) Assessment of the genetic polymorphism and biogenic amine production of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Greek red wines. Food Microbiol 29:113-120.

43. Garcia-Moruno E, Munoz R (2012) Does *Oenococcus oeni* produce histamine ? Int J Food Microbiol 157:121-129.

44. Lucas PM, Blancato VS, Claisse O, Magni C, Lolkema JS, Lonvaud-Funel A (2007) Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. Microbiol 153:2221-2230.

45. Mira de Orduña R, Patchett ML, Liu SQ, Pilone GJ (2001) Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. Appl Environ Microbiol 67:1657-1662.

46. Liu SQ, Pilone GJ (1998) Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. J Appl Microbiol 84:315-327.

47. Mangani S, Guerrini S, Granchi L, Vincenzini M (2005) Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. Curr Microbiol 51:6-10.

48. Coton E, Rollan G, Bertrand A, Lonvaud-Funel A (1998) Histamine producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. Am J Enol Vitic 49:199-204.

49. Moreno-Arribas V, Torlois S, Joyeux A, Bertrand A, Lonvaud- Funel A (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. J Appl Microbiol 88:584-593.

50. Alberto MR, Arena ME, Manca de Nadra MC (2007) Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. Food Control 18:898-903.

51. Hernández-Borges J, D'Orazio G, Aturki Z, Fanali S (2007) Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. J Chromatogr *A* 1147:192-199.

52. Rimaux T, Vrancken G, Pothakos V, Maes D, De Vuyst L, Leroy F (2011) The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. Food Microbiol 28:597-604.

53. Araque I, Reguant C, Rozès N, Bordons A (2011) Influence of wine-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria. Int Microbiol 14:225-233.

Table 1 Presence of genes encoding proteins involved in the production of tyramine, histamine and putrescine in *O. oeni* isolates

Amine	Tyramine	Histamine		Putrescine	
Target gene	*tyrdc*	*hdcA*	*agdi*	*odc*	*arcA, arcB, arcC, arcD1, arcD2*
No. strains tested	80	80	80	27	5
Strains (+)	41%	6%	0%	19%	100%

Table 2 Characteristics of five *O. oeni* isolates with multiple BA production-associated genes

tyrdc$^+$/*hdc*$^+$/cluster *arc*$^+$/*odc*$^+$	*tyrdc*$^+$/cluster *arc*$^+$/*odc*$^+$	Cluster *arc*$^+$/*odc*$^+$
Isolates7 and 26	Isolates23 and 34	Isolate37

Table 3 Biogenic amine productions in CDM at two pH values, by the five *O. oeni* isolates studied

Strain	pH	Agmatine (mg/l)	Putrescine (mg/l)	Phenylethylamine (mg/l)
7	5.3	120 ± 2.9	nd	nd
	4	27 ± 0.2	nd	nd
34	5.3	63.9 ± 0.8	nd	0.6 ± 0.1
	4	20.1 ± 0.1	nd	0.3 ± 0.1
26	5.3	81.5 ± 1.3	0.4 ± 0.04	nd
	4	3.4 ± 0.1	nd	nd
37	5.3	nd	nd	nd
	4	0.7 ± 0.1	nd	nd
23	5.3	90.4 ± 1.6	nd	nd
	4	0.1± 0.1	nd	nd

nd: not detected , values are the means of two independent experiments

Table 4 Arginine consumption and metabolite production by *O. oeni* isolates 7 and 34 after incubation at 25°C for 3 hours in citrate-phosphate buffer

Strain	Arginine consumption (µM)	Metabolite production (µM)		
		Agmatine	Ornithine	Citrulline
7	3475.3 ± 13.8	1862.6 ± 7.7	1581.4 ± 0.1	10.8 ± 0.6
34	609.6 ± 2.3	402.4 ± 1.6	202.7 ± 0.8	2.8 ± 0.6

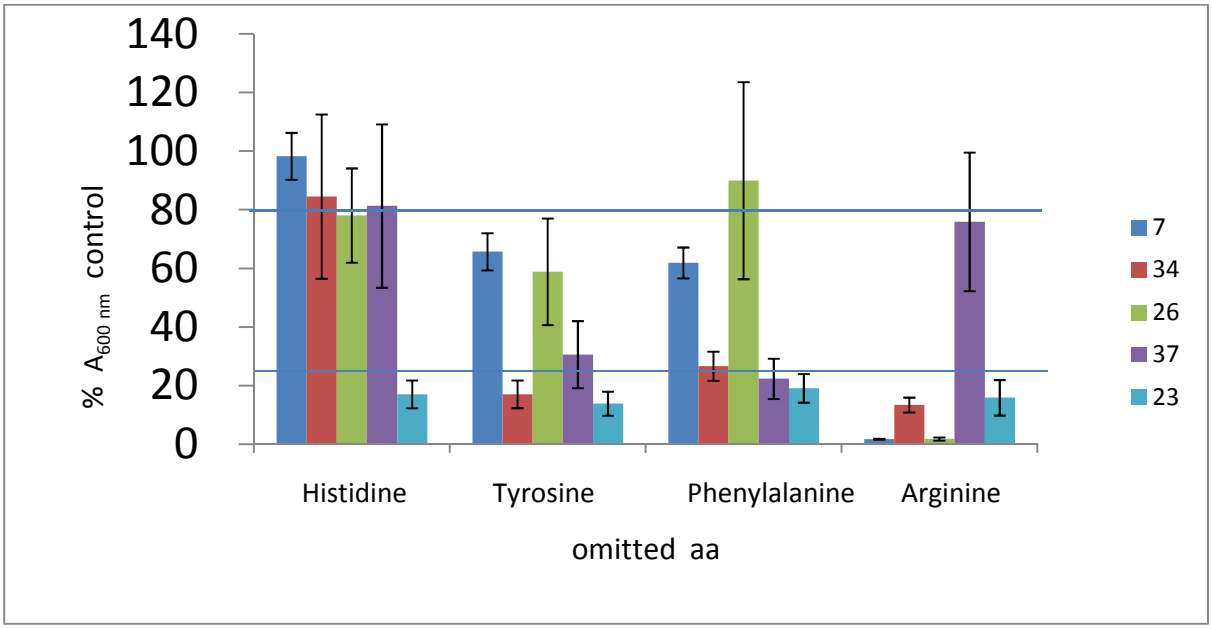


Fig. 1 Growth yields on CDM lacking the indicated amino acid.

Data are expressed as the percentage of the $A_{600\ nm}$ value measured during the stationary phase for each isolate on the control CDM, containing all four of the amino acids tested.

Résumé

Dans le vin, les amines biogènes sont essentiellement d'origine microbienne, et sont produites notamment par les bactéries lactiques *Oenococcus oeni*, principal agent responsable de la fermentation malolactique, possède de nombreuses auxotrophies vis-à-vis des acides aminés. Aucune étude n'a été menée sur la relation entre l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé et le niveau de l'amine correspondante. 80 souches de *Oenococcus oeni* ont été isolées de vins rouges. Leurs auxotrophies vis-à-vis d'acides aminés précurseurs d'amines biogènes (Arg, Tyr, His et Phe) ainsi que la présence de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des amines ont été étudiées. Aucune relation entre auxotrophie et niveau de production d'amines ne peut être établie pour les souches testées. La présence de gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse d'amines n'est pas non plus corrélée avec la production effective d'amines. Nous montrons pour la première fois que *Oenococcus oeni* est un producteur d'agmatine. Cette production est étroitement liée à la souche bactérienne. La souche la plus adaptée au milieu acide est celle qui consomme le plus l'arginine et en proportions équivalentes par les 2 voies : voie de l'arginine déiminase et voie de l'arginine décarboxylase. L'effet d'une addition d'agmatine dans des vins montre une atténuation de l'effet boisé du Chardonnay sans doute par formation de base de Schiff ente les composés d'arôme et cette amine.

Mots clés : Vin - *Oenococcus oeni* – auxotrophie - agmatine

Abstract

In wine biogenic amines (BA) are mainly of microbial origin, *Oenococcus oeni*, the main responsible for malolactic fermentation, has been identified as a BA producer from nitrogen precursors. *Oenococcus oeni* possess numerous amino acid auxotrophies that are precursors of biogenic amines. No study has been done so far to look at the relationship between auxotrophy for amino acids precursors of BA and the level of BA in the medium. In order to do so, 80 *Oenococcus oeni* strains were isolated from red wines. The detection of genes encoding the different decarboxylases responsible for BA synthesis has been realised. In parallel, the auxotrophy for the four amino acids (Arg, Tyr, His, Phe) precursors of BA has characterized. Our results demonstrate that there is not direct correlation between auxotrophy and the accumulation of the corresponding BA as well as between the presence of decarboxylase gene and the accumulation of the corresponding BA. High levels of agmatine produced from arginine decarboxylation by *Oenococcus oeni* is reported for the first time.
Agmatine production is strain dependant. the most adapted to acidic environment is the strain whith use arginine in higher level with same proportion for ADI pathway and arginine decarboxylase. Agmatine addition in wines reduce woody aroma probably by formation of sciff bases between aromla compounds and amine.

Keywords : Wine - *Oenococcus oeni* – auxotrophy – amine production - agmatine