

**THESE**

*pour le*

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II**

*Mention : Sciences, Technologie, Santé*

*Option : Œnologie*

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2012 par

**Marion FAVIER**

**Etude des plasmides et génomes d'*Oenococcus oeni* pour  
l'identification des gènes d'intérêt technologique**

**Membres du Jury**

Mr. P. RITZENTHALER	<i>Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse</i>	Président
Mr. A. BORDONS	<i>Professeur à l'Université Rovira i Virgili de Catalogne</i>	Rapporteur
Mr. J. GUZZO	<i>Professeur à l'Université de Bourgogne</i>	Rapporteur
Mr. P. DARRIET	<i>Professeur à l'Université Bordeaux Segalen</i>	Examineur
Mme. V. MOINE	<i>Directrice scientifique du groupe LAFFORT, Bordeaux</i>	Examineur
Mr. P. LUCAS	<i>Professeur à l'Université Bordeaux Segalen</i>	Directeur de thèse



## Remerciements

*Je voudrais commencer par adresser mes sincères remerciements à Mr Paul RITZENTHALER, Mr Albert BORDONS, Mr Jean GUZZO et Mr Philippe DARRIET pour avoir accepté de juger ce travail de thèse ainsi que pour leurs encouragements et leurs précieux conseils.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier mon « grand maître », Patrick LUCAS, pour m'avoir accueilli dans l'équipe de Microbiologie et pour m'avoir proposé un sujet aussi passionnant. Merci pour ton accompagnement, tes enseignements et pour la grande confiance que tu m'as accordé. Ce fût un réel plaisir de travailler ensemble.*

*Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr Luc LAFFORT et à l'équipe de la société LAFFORT et du laboratoire SARCO pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions. Je remercie en particuliers Virginie MOINE et Joana COULON pour leur disponibilité, leur soutien et leurs conseils.*

*Merci à Philippe pour l'initiation aux « statistiques pour les nuls » et pour le temps que tu y as consacré.*

*Merci à Claire, Marguerite et Olivier pour leurs remarques avisées et leur soutien.*

*Un grand Merci à Cécile pour m'avoir soutenue du début à la fin, aussi bien sur le plan professionnel que personnel.*

*Un grand Merci à mes chouchoutes, Julie et Maria, pour leur amitié, leur sourire, leur enthousiasme, leur écoute et leurs encouragements.*

*Bien évidemment, je remercie toute l'équipe du laboratoire qui a fait de chaque instant, un moment agréable et chaleureux. Merci à Andrea, Geoffrey, Marie, Marine, Guillerm, Féty, Marie-Louise, Guy, Isabelle, Marina et Aline. Merci à la relève de la LUCAS Team, Mariette et Hugo, pour leur aide précieuse.*

*Je pense également à l'équipe du « Hall Techno » et je les remercie pour leur bonne humeur permanente qui a ponctué mes journées au cours de ces trois années.*

*Merci à tous mes amis pour leur soutien. Un petit clin d'œil aux corréziens et un grand merci à Fanny, toujours là quand j'en avais besoin.*

*Et le meilleur pour la fin, je remercie ma famille pour m'avoir permis d'arriver jusque là ainsi que pour leurs encouragements continus. Enfin, j'attribue une palme d'or à Daniel pour m'avoir « supportée » au cours de ces trois dernières années.*



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. <i>Oenococcus oeni</i>, la bactérie du vin .....</b>	<b>3</b>
1.1. La fermentation malolactique, une étape essentielle .....	3
1.2. L'espèce <i>Oenococcus oeni</i> .....	7
1.3. Diversité phénotypique de l'espèce <i>O. oeni</i> .....	9
1.4. Caractéristiques génétiques de l'espèce <i>O. oeni</i> .....	10
<b>2. L'analyse des plasmides et génomes d'<i>O. oeni</i> .....</b>	<b>13</b>
2.1. Les plasmides des bactéries lactiques .....	13
2.1.1. Définition .....	13
2.1.2. Réplication, stabilité et conjugaison .....	14
2.1.3. Distribution et fonctions accessoires des plasmides .....	17
2.1.4. pEB03, le premier grand plasmide thêta séquencé chez <i>O. oeni</i> .....	19
2.2. Les génomes des bactéries lactiques .....	21
2.2.1. Evolution des techniques de séquençage .....	21
2.2.2. L'analyse des génomes des bactéries lactiques.....	24
2.2.3. Les premiers travaux de génomique chez l'espèce <i>O. oeni</i> .....	26
<b>3. Les levains malolactiques .....</b>	<b>28</b>
3.1. Généralités.....	28
3.2. Sélection des levains malolactiques.....	29
3.2.1. Principales étapes et critères de sélection .....	29
3.2.2. Les premiers travaux de sélection, approches phénotypiques .....	30
3.2.3. Sélection : premières approches de biologie moléculaire.....	30
3.2.4. Sélection : combinaisons d'approches phénotypiques et moléculaires.....	32



3.3. Production des levains malolactiques .....	34
3.3.1. L'importance des conditions de production .....	34
3.3.2. Principe de la lyophilisation .....	35
3.3.3. Préparation industrielle des levains malolactiques .....	36
3.4. Conservation et réhydratation des levains malolactiques .....	38
3.4.1. Importance des conditions de conservation .....	38
3.4.2. Réhydratation et acclimatation .....	38
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>40</b>
<b>1. Bactéries, conditions de culture, lyophilisation et conservation .....</b>	<b>40</b>
1.1. Souches du genre <i>Oenococcus</i> .....	40
1.2. Culture des souches d' <i>O. oeni</i> .....	40
1.3. Procédé de lyophilisation des bactéries .....	41
1.4. Conservation des bactéries .....	41
<b>2. Analyses microbiologiques, chimiques et biochimiques .....</b>	<b>42</b>
2.1. Mesure de la croissance bactérienne .....	42
2.1.1. Mesure de la turbidité d'une suspension cellulaire .....	42
2.1.2. Dénombrement des colonies sur milieu solide .....	42
2.1.3. Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence .....	42
2.2. Dosage enzymatique .....	43
2.2.1. Dosage de l'acide L-malique .....	43
2.2.2. Dosages de l'acide citrique et de l'acide acétique .....	43
2.3. Dosage par chromatographie sur couche mince .....	44
<b>3. Microvinifications .....</b>	<b>46</b>
3.1. Mode d'inoculation des bactéries .....	46
3.2. Microvinifications dans un vin " modèle " .....	46
3.2.1. Préparation d'un vin " modèle " .....	46
3.2.2. Inoculation et suivi de fermentation .....	47
3.3. Microvinifications dans un moût " modèle " .....	48



---

<b>4. Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>49</b>
4.1. Extraction des acides nucléiques .....	49
4.1.1. Extraction de l'ADN génomique, protocole classique .....	49
4.1.2. Extraction de l'ADN génomique, protocole adapté au milieu vin .....	49
4.1.3. Extraction de l'ADN génomique, technologie Whatman FTA.....	50
4.2. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne .....	51
4.2.1. PCR classique .....	51
4.2.2. PCR sur colonies .....	52
4.2.3. PCR RAPD multiplex.....	52
4.2.4. PCR quantitative en temps réel .....	53
4.3. Migration des acides nucléiques par électrophorèse .....	54
4.3.1. Electrophorèse en champs constant sur gel d'agarose .....	54
4.3.2. Electrophorèse capillaire à puce.....	54
4.3.3. Technique REA-PFGE .....	55
4.4. Séquençage de l'ADN.....	57
4.4.1. Séquençage de fragments d'ADN par la méthode de Sanger .....	57
4.4.2. Séquençage des génomes complets par la technologie 454 .....	57
<b>5. Analyses bioinformatiques .....</b>	<b>59</b>
5.1. Analyse d'une séquence nucléique et protéique .....	59
5.2. Analyse des structures de population .....	60
5.2.1. Analyse des profils de restriction obtenus par REA-PFGE .....	60
5.2.2. Analyse MLST.....	60
5.3. Assemblage, annotation et comparaison des génomes .....	61
5.4. Analyses statistiques.....	62
5.4.1. Analyses classiques.....	62
5.4.2. Courbe ROC .....	63



**RESULTATS ET DISCUSSION ..... 65****Chapitre 1, Recherche de gènes d'intérêt technologique chez *O. oeni* : étude des plasmides.....65****1. Essais de développement d'une méthode de purification des grands plasmides chez *O. oeni* ..... 65****2. Analyse du plasmide pOENI-1..... 67**

2.1. Rappels du contexte de ces travaux ..... 67

2.2. Analyse de l'origine de répllication et de la protéine RepA ..... 68

2.3. Identification d'un module d'addiction toxine-antitoxine..... 69

2.4. Identification d'une perméase de la famille TauE ..... 70

2.5. Comparaison avec les plasmides de bactéries lactiques ..... 71

**3. Analyse de la distribution du plasmide pOENI-1 chez *O. oeni* ..... 73**

3.1. Détection du plasmide par PCR dans une collection de 44 souches ..... 73

3.2. Détection et identification des plasmides par analyse des génomes..... 74

3.3. Identification des localisations génomiques des gènes *oye* et *tauE*..... 76

3.4. Distribution des plasmides de type pOENI-1 et des gènes associés..... 77

**4. Nombre de copies par cellule et stabilité des plasmides ..... 79**

4.1. Nombre de copies des plasmides par cellule..... 79

4.2. Obtention de clones dépourvus de plasmides. .... 79

4.3. Evaluation de la stabilité des plasmides au cours de la vinification ..... 80

**5. Recherche de phénotypes associés aux plasmides de type pOENI-1 ..... 82**

5.1. Capacités de résistance à différents facteurs de stress..... 82

5.2. Capacités de résistance à l'étape de congélation-lyophilisation ..... 82

5.3. Capacités de survie à l'inoculation dans le vin..... 83

5.4. Capacités à mener la FML ..... 83



---

5.5. Capacités à se développer au cours des étapes précédant la FML .....	84
<b>6. Fréquence des plasmides de type pOENI-1 dans les vins .....</b>	<b>86</b>
<b>7. Discussion .....</b>	<b>88</b>
7.1. Plasmides d' <i>O. oeni</i> .....	88
7.2. Plasmides de la " famille pOENI-1 " .....	89
7.3. Prédominance des plasmides chez les levains malolactiques et les souches indigènes menant la FML.....	91
7.4. Rôle potentiel des plasmides de la famille " pOENI-1 " .....	92
<b>Chapitre 2, Recherche de gènes d'intérêt technologique chez <i>O. oeni</i> : étude des génomes. ....</b>	<b>94</b>
<b>1. Caractérisation phénotypique de 44 souches d'<i>O. oeni</i> .....</b>	<b>94</b>
1.1. Sélection des souches .....	94
1.2. Typage génétique des souches .....	95
1.3. Elaboration d'un protocole de caractérisation technologique.....	96
1.4. Détermination des phénotypes d'intérêt technologique .....	97
1.4.1. Rendement de production sous forme lyophilisée .....	97
1.4.2. Survie à l'inoculation .....	99
1.4.3. Capacités fermentaires.....	100
1.5. Corrélation entre les phénotypes d'intérêt technologique et les groupes génétiques	102
<b>2. Analyse et comparaison des génomes d'<i>O. oeni</i>.....</b>	<b>103</b>
2.1. Séquençage, assemblage et annotation des génomes.....	103
2.2. Caractéristiques générales des génomes.....	104
2.3. Recherche de corrélations entre génomes et phénotypes.....	105
2.3.1. Analyse des génomes de différents groupes de souches .....	105
2.3.2. Détection de régions de plasticité génomique .....	107
2.3.3. Analyse de la collection de 44 souches d' <i>O. oeni</i> .....	108
2.3.4. Choix des analyses statistiques pour la validation des gènes d'intérêt.....	109
2.3.5. Validation des gènes d'intérêt par analyses statistiques .....	110



<b>3. Discussion</b> .....	<b>113</b>
3.1. Identification de gènes d'intérêt technologique .....	113
3.2. Intérêt des résultats pour la sélection des souches d' <i>O. oeni</i> .....	115
3.3. La diversité des souches de l'espèce <i>O. oeni</i> .....	116

## **Chapitre 3, Applications technologiques : sélection de souches d'intérêt industriel.....119**

<b>1. Sélection de souches d'intérêt industriel</b> .....	<b>119</b>
1.1. Isolement de souches candidates .....	119
1.2. Sélection génétique .....	120
1.3. Choix d'un protocole de sélection phénotypique.....	121
1.4. Sélection phénotypique, au laboratoire .....	122
1.5. Sélection par des tests de vinification en conditions réelles .....	122
1.6. Mise en place d'une méthode de contrôle d'implantation rapide.....	124
<b>2. Impact des levains malolactiques sur les bactéries d'altération</b> .....	<b>126</b>
<b>3. Discussion</b> .....	<b>129</b>

## **CONCLUSION GENERALE ..... 131**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 134**

## **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES..... 152**



# LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Les principales conséquences et les mécanismes cellulaires de la FML.

**Figure 2.** Métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques du vin.

**Figure 3.** Biosynthèse des principales amines biogènes du vin par les bactéries lactiques.

**Figure 4.** Position phylogénétique de l'espèce *O. oeni*.

**Figure 5.** Présence et absence des gènes *mutS-mutL* chez les bactéries lactiques.

**Figure 6.** Contenu en éléments IS30 des deux " sous-populations " A et B de l'espèce *O. oeni*.

**Figure 7.** Réplication par cercle roulant.

**Figure 8.** Carte génétique du plasmide pEB03 isolé de la souche VF.

**Figure 9.** Élément mobile de quatre gènes communs au plasmide pEB03 (=pOENI-1) et à une région chromosomique de la souche ATCC BAA 1163.

**Figure 10.** Principales étapes de la technologie de séquençage 454.

**Figure 11.** Carte du génome de la souche d'*O. oeni* PSU-1.

**Figure 12.** Composition du pan-génome de 14 souches d'*O. oeni*.

**Figure 13.** Facteurs influençant la survie des bactéries lactiques au cours des différentes étapes des procédés de congélation et lyophilisation.

**Figure 14.** Réalisation d'une courbe " standard ".

**Figure 15.** Courbes " standard " des gènes *oye* et *rpoB* pour la détermination du nombre de copies de plasmides par cellule.

**Figure 16.** Courbes " standard " des gènes *oye*, *tauE* et *rpoB* pour leur détection et leur quantification dans le vin.

**Figure 17.** Données générées par le logiciel MultiNA viewer.

**Figure 18.** Démarche suivie pour la recherche de gènes spécifiques d'un phénotype.

**Figure 19.** Définition et composition du pan-génome.

**Figure 20.** Détermination et signification de la sensibilité et de la spécificité, appliquées à un diagnostic clinique.

**Figure 21.** Distribution des résultats d'un test clinique en fonction du caractère " malade " M+ et " non malade " M-.

**Figure 22.** Représentation graphique d'une courbe ROC.

**Figure 23.** Essais de purification des plasmides d'*O. oeni* par lyse alcaline suivie d'une électrophorèse en champs pulsé.

**Figure 24.** Carte génétique de pOENI-1 mise à jour.

**Figure 25.** Profil de la stabilité thermodynamique de la séquence pOENI-1.

**Figure 26.** Identification et visualisation des domaines protéiques codés par l'ORF 8.

**Figure 27.** Alignements des séquences similaires entre pOENI-1 et deux plasmides de bactéries lactiques.



- Figure 28.** Distribution des plasmides de type pOENI-1 parmi 59 souches d'*O. oeni*.
- Figure 29.** Alignement des séquences de pOENI-1 et de la forme variante pOENI-1v2.
- Figure 30.** Contrôle des souches dépourvues de plasmides.
- Figure 31.** Cinétiques de croissance des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- en présence de différents facteurs de stress.
- Figure 32.** Population de cellules viables après acclimatation et après inoculation dans le vin.
- Figure 33.** Comparaison des souches VF+ et VF- au cours de la FML dans un vin modèle.
- Figure 34.** Comparaison des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- au cours de la FML dans un vin de Merlot.
- Figure 35.** Comparaison des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- au cours de la vinification.
- Figure 36.** Fréquence des gènes *tauE* et *oye* au cours des fermentations du vin.
- Figure 37.** Détection de pOENI-1 et des plasmides associés dans les vins.
- Figure 38.** Typage des 44 souches d'*O. oeni* par NotI-PFGE.
- Figure 39.** Comparaison d'essais de FML en inoculation directe ou après acclimatation.
- Figure 40.** Rendement de production des 44 souches d'*O. oeni*.
- Figure 41.** Taux de survie à l'inoculation dans le vin des 44 souches d'*O. oeni*.
- Figure 42.** Cinétiques fermentaires des 44 souches d'*O. oeni*.
- Figure 43.** Corrélation entre la dégradation de l'acide citrique et la production d'acide acétique.
- Figure 44.** Profils phénotypiques des 44 souches d'*O. oeni* typées par NotI-PFGE.
- Figure 45.** Visualisation des contaminations génomiques.
- Figure 46.** Régions de plasticité génomique détectées sur le chromosome d'*O. oeni*.
- Figure 47.** Distribution des gènes d'intérêt au sein de la collection de 44 souches d'*O. oeni*.
- Figure 48.** Exemples de courbes ROC.
- Figure 49.** Courbes ROC générées pour chaque couple " gène - variable phénotypique ".
- Figure 50.** Sélection des souches de la collection présentant les meilleures cinétiques fermentaires.
- Figure 51.** PCR spécifique de la souche S11.
- Figure 52.** Capacités des souches IOEB 0607 et S22 à produire des amines biogènes au cours de FML menées à différents pH.
- Figure 53.** Impact des durées de FML sur la production de putrescine.



# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Critères de sélection des levains malolactiques.

**Tableau 2.** Liste des 44 souches d'*Oenococcus oeni*.

**Tableau 3.** Liste des souches d'*O. oeni* dont le génome est séquencé.

**Tableau 4.** Bilan physico-chimique du vin " modèle "

**Tableau 5.** Liste des amorces utilisées.

**Tableau 6.** Conditions de migration des électrophorèses par champ pulsé.

**Tableau 7.** Mise à jour de l'annotation de pOENI-1.

**Tableau 8.** Plasmides de bactéries lactiques similaires à pOENI-1.

**Tableau 9.** Recherche des plasmides de type pOENI-1 dans les génomes d'*O. oeni*.

**Tableau 10.** Détermination du nombre de copies de plasmide par cellule.

**Tableau 11.** Paramètres mesurés au cours de la production sous forme lyophilisée.

**Tableau 12.** Pourcentage de cellules avec et sans plasmide à différents temps de la vinification.

**Tableau 13.** Paramètres de production des 44 souches d'*O. oeni* sous forme lyophilisée.

**Tableau 14.** Table des corrélations  $\rho$  de Spearman.

**Tableau 15.** Caractéristiques des séquences génomiques des souches d'*O. oeni*.

**Tableau 16.** Choix des groupes phénotypiques à comparer pour chaque variable sélectionnée.

**Tableau 17.** Présence/absence des gènes chez les 13 souches séquencées et caractérisées pour les variables " taux de survie " et " FML active ".

**Tableau 18.** Validation des gènes d'intérêt technologique par les analyses statistiques.

**Tableau 19.** Bilan des essais menés en laboratoire et sur le terrain pour la sélection de nouvelles souches oenologiques.



# LISTE DES PRINCIPALES ABBREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonuléique
<b>ADNg</b>	ADN génomique
<b>ADNr</b>	ADN ribosomique
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNr</b>	ARN ribosomique
<b>ARNt</b>	ARN de transfert
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AUC</b>	Aire sous la courbe ROC
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>COG</b>	Clusters of Orthologous Groups of proteins
<b>C<sub>T</sub></b>	Cycle treshold
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tetra-acétate
<b>FA</b>	Fermentation alcoolique
<b>FML</b>	Fermentation malolactique
<b>FMN</b>	Flavine mononucléotide
<b>g</b>	Accélération de la pesanteur
<b>IOEB</b>	Institut d'œnologie de Bordeaux
<b>IS</b>	Séquence d'insertion
<b>Min</b>	Minute
<b>MLST</b>	Multi Locus Sequence Type
<b>MMR</b>	DNA Mismatch repair
<b>m/s</b>	Mètre par seconde
<b>NA</b>	Non analysé
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>ND</b>	Non disponible
<b>NJ</b>	Neighbor-Joining
<b>ORF</b>	Open Reading Frame



<b>OYE</b>	Old Yellow Enzyme
<b>REA- PFGE</b>	Restriction Enzymatic Analysis - Pulse Field Gel Electrophoresis
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>ppi</b>	Pour préparation injectable
<b>PVP</b>	Polyvynilpyrrolidone
<b>p/p</b>	Poids par poids
<b>p/v</b>	Poids par volume
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>ROC</b>	Receiver Operating Curve
<b>s</b>	Seconde
<b>TAE</b>	Tris-acétate-EDTA
<b>TAP</b>	Titre alcoométrique probable
<b>TAV</b>	Titre alcoométrique volumique
<b>TBE</b>	Tris-borate-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Tris</b>	Tris hydroxyméthyl aminométhane
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VNTR</b>	Multiple-locus Variable Number of Tandem Repeat analysis
<b>v/v</b>	Volume par volume



# **INTRODUCTION**



L'élaboration du vin met en jeu divers processus microbiens impliquant une variété d'espèces levuriennes et bactériennes naturellement présentes dans le moût de raisin ou ajoutées sous la forme de préparations industrielles. La première transformation du moût correspond à la fermentation alcoolique. Elle est initiée par les levures et typiquement par l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* qui réalise principalement la conversion des sucres du raisin en alcool. La fermentation malolactique survient dans la plupart des cas après la fermentation alcoolique. Elle est mise en œuvre par les bactéries lactiques et résulte de la décarboxylation de l'acide L-malique du raisin en acide L-lactique. Elle induit une désacidification et un "assouplissement" du vin, mais elle participe également à sa complexité aromatique et à sa stabilisation microbiologique.

Depuis sa mise en évidence au début des années 1960, *Oenococcus oeni* est considérée comme étant la bactérie lactique associée à la fermentation malolactique. Bien qu'elle soit minoritaire sur la baie de raisin et peu présente dans le moût, elle se développe spontanément pendant ou après la fermentation alcoolique et devient l'espèce majoritaire. Toutefois, il existe une grande diversité de souches d'*O. oeni* qui sont plus ou moins désirables dans l'élaboration du vin. Elles diffèrent notamment par leur capacité d'adaptation au vin, leur efficacité fermentaire ou la production d'arômes et de composés d'altération. Pour ces raisons, la fermentation malolactique est souvent imprévisible, menant parfois à des fermentations languissantes, sources éventuelles d'un développement de microorganismes d'altération ou de déviations organoleptiques. Comme pour la fermentation alcoolique, le recours à l'inoculation du vin avec des souches d'*O. oeni* sélectionnées est devenu une pratique courante pour maîtriser la fermentation malolactique.

Un levain malolactique est une souche bactérienne (*O. oeni* principalement) isolée d'un vin en cours de fermentation malolactique spontanée, sélectionnée en laboratoire pour ses propriétés technologiques, produite et utilisée en quantité suffisante pour assurer le déclenchement et la dégradation rapide de l'acide L-malique présent dans le vin. Les protocoles de sélection des souches d'intérêt industriel sont divers et variés. Ils visent à déterminer la capacité des souches à mener des fermentations rapides et complètes dans différentes conditions et types de vin, mais également à vérifier l'absence de métabolismes préjudiciables à la qualité du vin et à contrôler leur capacité de résistance aux procédés de



production industrielle. Malgré les nouvelles connaissances sur la génétique de l'espèce *O. oeni*, la sélection des levains malolactiques reste essentiellement basée sur des tests phénotypiques longs et contraignants.

Dans ce contexte, cette étude soutenue par la société LAFFORT visait à identifier des gènes d'intérêt technologique à travers l'étude des plasmides et génomes de l'espèce *O. oeni*, afin d'expliquer la grande diversité phénotypique observée entre les souches et de s'orienter vers une sélection génétique des levains malolactiques. Cette approche repose sur l'hypothèse que les performances technologiques des souches d'intérêt industriel sont, en partie au moins, associées à la présence de certains gènes sur leur génome.

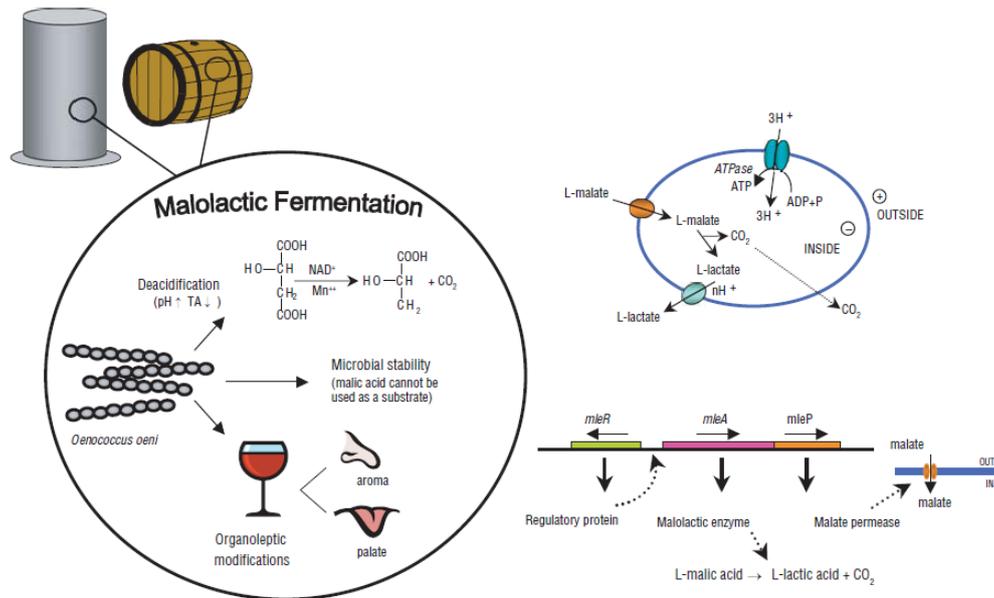
Premièrement, nous avons recherché des gènes d'intérêt technologique sur les plasmides d'*O. oeni*. Il s'agissait ici d'isoler, séquencer et caractériser des plasmides afin de déterminer leur rôle potentiel dans l'adaptation des souches aux procédés de production industrielle et aux conditions œnologiques. Pour cela, nous avons tout d'abord tenté de développer une technique de purification des grands plasmides. Puis, nous avons étudié un plasmide en particulier qui a été isolé d'un levain malolactique et séquencé au laboratoire. Les résultats obtenus ont permis d'identifier des gènes d'intérêt technologique potentiel et d'apporter de nouvelles connaissances sur les plasmides d'*O. oeni*.

Deuxièmement, nous avons tenté d'identifier des gènes d'intérêt technologique à travers l'analyse des génomes d'*O. oeni*. L'objectif ici était de rechercher des corrélations entre les phénotypes d'intérêt industriel et la présence de certains gènes. Pour cela, les propriétés technologiques de 44 souches ont été déterminées et les génomes de 13 d'entre elles ont été séquencés. Ce travail a permis d'identifier plusieurs gènes et régions de plasticité génomique associés aux phénotypes d'intérêt et de proposer une approche génétique pour la sélection des souches d'*O. oeni* d'intérêt industriel.

Un troisième volet a concerné les applications technologiques résultant des travaux réalisés. Un des objectifs industriels était de sélectionner de nouveaux levains malolactiques à travers une caractérisation génétique et phénotypique de nouvelles souches isolées au cours de l'étude. Deux souches ont été proposées et une d'entre elles est aujourd'hui commercialisée.



# **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



**Figure 1. Les principales conséquences et les mécanismes cellulaires de la FML.** La FML participe à la désacidification, la stabilité microbiologique et la complexité aromatique du vin. La réaction malolactique nécessite le transport de l'acide L-malique, sa décarboxylation intracellulaire et l'export de l'acide L-lactique formé. Un opéron de deux gènes *mleA*, *mleP* précédé d'un gène de régulation *mleR*, composent cette voie métabolique. Ils codent pour un régulateur de transcription (*mleR*), l'enzyme malolactique (*mleA*) et la malate perméase (*mleP*). (D'après Bartowsky, 2005)

## 1. *Oenococcus oeni*, la bactérie du vin

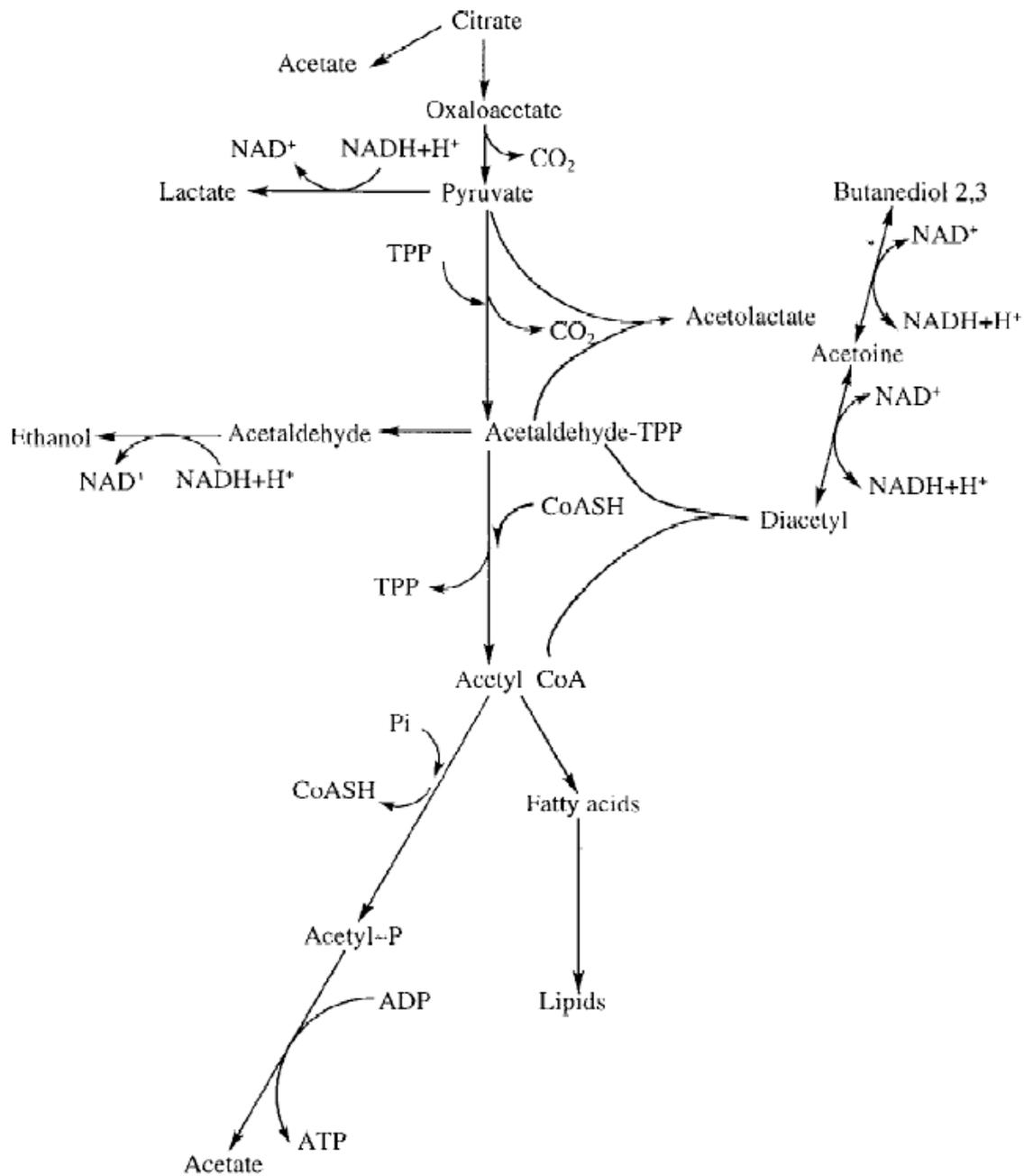
### 1.1. La fermentation malolactique, une étape essentielle

Au début du 20<sup>ième</sup> siècle, Müller-Thurgau et Osterwalder décrivent pour la première fois, la réaction de décarboxylation de l'acide L-malique du vin en acide L-lactique et dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) sous l'action des bactéries. Ils nomment ce phénomène " désacidification biologique " ou " fermentation malolactique " (Müller-Thurgau and Osterwalder, 1913). Quelques temps plus tard, Ferré (1922), en Bourgogne, et Ribéreau-Gayon (1936), à Bordeaux, associent la FML à une amélioration considérable de la qualité organoleptique des vins de Chardonnay et des vins rouges. Depuis lors, la FML a été l'objet de nombreuses études et se décrit aujourd'hui, comme une étape essentielle à l'élaboration de la plupart des vins rouges et de certains vins blancs de garde, en participant à leur désacidification, leur complexité aromatique et leur stabilisation microbiologique (Davis et al., 1985 ; Lonvaud-Funel, 1999 ; Versari et al., 1999 ; Liu, 2002 ; Bartowsky, 2005) (Figure 1). La FML survient spontanément après la fermentation alcoolique, lorsque la population bactérienne atteint 10<sup>6</sup> cellules/ml. C'est un phénomène dont le succès dépend directement de la population cellulaire, de l'activité malolactique spécifique des cellules et de nombreux autres facteurs tels que les paramètres physico-chimiques du vin ou les pratiques de vinification.

#### Conséquences bénéfiques de la FML sur la qualité du vin

Le principal intérêt de la FML est la diminution de l'acidité du vin. L'acide L-malique est un acide dicarboxylique au goût acide prononcé, qui apporte " dureté " et " verdeur " au vin. On le retrouve naturellement dans le moût de raisin et le vin à des teneurs allant de 1 à 8 g/l, selon les cépages, les régions de production et la maturité des raisins. Sa conversion en un monoacide, l'acide L-lactique, se traduit par une diminution de l'acidité totale du vin, une légère augmentation du pH et un net " assouplissement " du goût du vin. En effet, l'acide lactique est perçu comme étant plus suave et plus agréable que l'acide malique (Figure 1).

Outre la diminution du caractère " acide ", des modifications organoleptiques plus subtiles liées aux métabolismes annexes à celui de l'acide L-malique interviennent durant la FML. Selon Henick-Kling (1993), elle améliore le caractère fruité du vin et diminue certains



**Figure 2. Métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques du vin.** Le diacétyle, l'acide acétique, l'acétoïne et le 2,3-butanediol participent significativement à l'évolution aromatique du vin au cours de la FML. (D'après Lonvaud-Funel, 1999)

arômes variétaux aux notes végétales et herbacées. De nombreuses autres caractéristiques sensorielles lui sont associées comme des notes de beurre, noisette, vanille, miel, boisées, grillées, fumées ou épicées. Les changements aromatiques sont principalement liés au métabolisme bactérien qui libère de nombreux acides, esters, alcools supérieurs et autres molécules pouvant modifier la perception sensorielle du vin. Une des principales modifications sensorielles de la FML est conférée par le diacétyl, qui est produit par le métabolisme de l'acide citrique des bactéries lactiques du vin (Figure 2). A faible concentration (généralement <10 mg/l), il apporte des notes agréables de noisette, grillées, toastées. Mais à des concentrations supérieures, le diacétyl peut être indésirable par son caractère beurré masquant de nombreux arômes du vin (Bartowsky and Henschke, 2004). Par ailleurs, les bactéries lactiques sont capables de convertir certains précurseurs d'arômes du raisin et du bois de chêne des barriques en divers composés aromatiques (de Revel et al., 1999 ; Bloem et al., 2008).

La stabilisation microbiologique du vin est aussi l'un des points forts en faveur de la FML. L'acide L-malique est une des principales sources nutritives utilisables par les bactéries lactiques dans le vin. Sa consommation au cours de la FML limite les possibilités de développement des bactéries d'altération au cours de l'élevage des vins. Elle empêche aussi qu'il puisse être consommé de manière incontrôlée lors de l'élevage ou de la conservation du vin, ce qui pourrait induire des modifications non désirées, voire des altérations. De plus, un début de FML bien maîtrisé et une occupation rapide de la niche écologique que constitue le vin après la FA, diminue le risque d'altération lié à la levure *Brettanomyces bruxellensis*, responsable du caractère phénolé de certains vins (Renouf and Murat, 2008).

#### Conséquences indésirables de la FML sur la qualité du vin

De façon générale, la FML améliore la qualité et la stabilité du vin. Néanmoins, elle peut aussi induire des modifications indésirables. La FML peut provoquer une diminution de la couleur du vin par la précipitation ou le changement de conformation des composés phénoliques tels que les anthocyanes (Davis *et al.*, 1985). De plus, les bactéries lactiques responsables de la FML peuvent parfois produire des altérations. Certaines d'entre elles sont associées aux "maladies du vin" observées par Pasteur (1866), comme la piqure lactique, l'amertume, la "tourne" et les vins "filants", diminuant considérablement les qualités

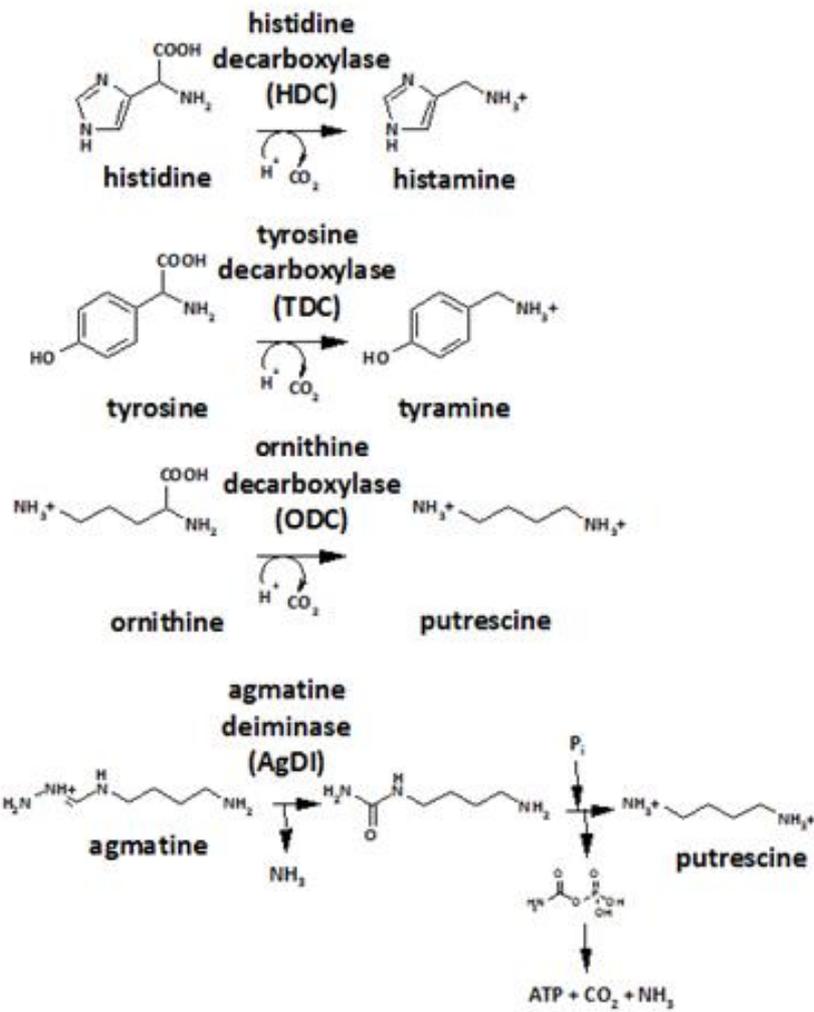


Figure 3. Biosynthèse des principales amines biogènes du vin par les bactéries lactiques.

organoleptiques du vin (Lonvaud-Funel and Joyeux, 1988 ; Lonvaud-Funel, 1999 ; Walling *et al.*, 2005). Certaines souches de bactéries lactiques produisent aussi, directement ou indirectement, des composés préjudiciables à la santé humaine comme les amines biogènes ou le carbamate d'éthyle.

Le carbamate d'éthyle est classé parmi les " molécules probablement cancérigènes pour l'homme ", il est retrouvé dans la majorité des produits fermentés à l'état de trace. La citrulline, intermédiaire du métabolisme de l'arginine chez les bactéries du vin est un précurseur de la formation du carbamate d'éthyle. Toutefois, les quantités produites par le métabolisme bactérien (ou levurien via un autre précurseur : l'urée) sont nettement inférieures à l'unique seuil officiel de 30 µg/l existant au Canada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Les amines biogènes sont aussi fréquemment retrouvées dans les aliments et à des teneurs élevées dans les produits fermentés : produits laitiers, sauces, charcuteries, champagnes, bières, cidres, vins, etc (Silla Santos, 1996). Elles peuvent provoquer des maux de tête et des réactions allergiques chez les personnes sensibles. Quelques souches de bactéries lactiques du vin sont capables de produire des amines biogènes au cours de la FML ou pendant l'élevage, par la décarboxylation de certains acides aminés (Lonvaud-Funel, 2001 ; Guerrini *et al.*, 2002b ; Marcobal *et al.*, 2006 ; Lucas *et al.*, 2008 ; Nannelli *et al.*, 2008 ; Coton *et al.*, 2010). Les principales amines biogènes retrouvées dans le vin sont l'histamine et la tyramine, issues respectivement du catabolisme de l'histidine et la tyrosine, et la putrescine formée par la décarboxylation de l'ornithine ou la désamination de l'agmatine (Figure 3). Leur détection est fréquente et elles présentent le principal risque sanitaire lié à la consommation de vin mais aucune réglementation n'existe aujourd'hui sur les teneurs en amines biogènes des vins.

#### Intérêts de la FML pour la bactérie

La réaction de décarboxylation de l'acide L-malique est catalysée par l'enzyme malolactique, qui a été décrite pour la première fois chez *Lactobacillus plantarum* puis chez de nombreuses autres bactéries lactiques du vin (Lonvaud-Funel, 1995). Son activité est optimale à pH 5,75 et nécessite la présence du cofacteur NAD<sup>+</sup> et d'ions Mn<sup>2+</sup>. Dès les premières études sur la réaction malolactique, il paraît évident qu'elle bénéficie à la

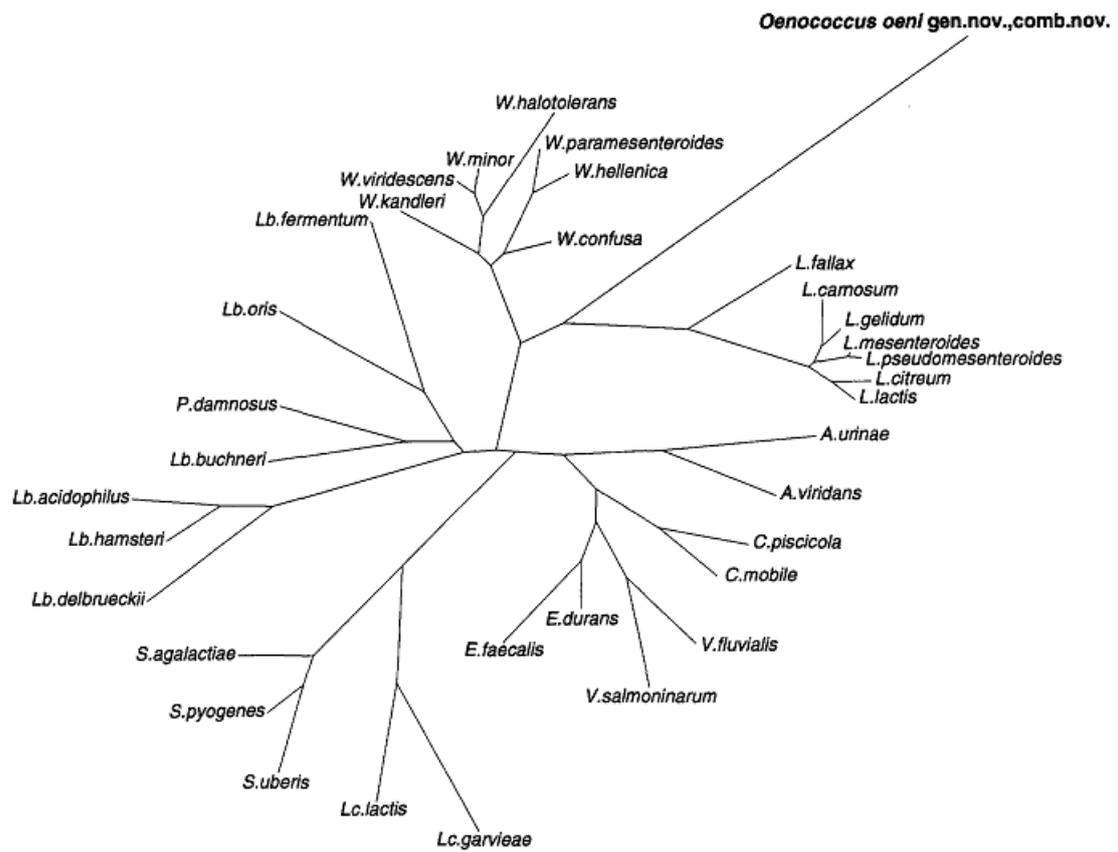


croissance bactérienne. La FML ne produit pas directement de l'ATP, mais elle le permet indirectement en générant une force proton motrice qui conduit à la synthèse d'ATP via les (H<sup>+</sup>)-ATPases membranaires (Figure 1). Elle permet aussi à la bactérie de réguler son pH intracellulaire car un proton est consommé par l'enzyme malolactique lors de la conversion de l'acide L-malique en acide L-lactique et CO<sub>2</sub>. La force proton motrice est issue de la différence de potentiel électrochimique produite de part et d'autre de la membrane plasmique par la translocation électrogénique des molécules de malate(-) et de lactate, et par le gradient de protons (plus important à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur) lié à la consommation d'un proton intracellulaire (Salema *et al.*, 1996).

### Facteurs défavorables à la FML

Le vin est un milieu contraignant qui peut inhiber la croissance bactérienne et compromettre l'initiation et le déroulement de la FML. La température, le pH, l'alcool et le SO<sub>2</sub> sont les facteurs les plus connus.

Idéalement, la FML doit être réalisée à 20°C, meilleur compromis entre la croissance des bactéries et l'activité malolactique. En effet, les températures élevées (30°C) propices aux activités enzymatiques diminuent la tolérance des bactéries face à l'éthanol. De plus, tout comme l'éthanol et le pH, la température provoque des réarrangements lipidiques et la dénaturation des protéines membranaires à l'origine d'une réduction des échanges membranaires et d'une perte de viabilité (Da Silveira *et al.*, 2003 ; Chu-Ky *et al.*, 2005 ; Coucheney *et al.*, 2005b). Malgré le caractère acidophile des bactéries lactiques, le pH (≈3,5) du vin exerce une forte pression sélective en faveur des espèces et des souches les plus résistantes aux bas pHs. Dans ce milieu, les bactéries doivent maintenir leur pH intracellulaire proche de la neutralité, via notamment les (H<sup>+</sup>)-ATPases membranaires. La tolérance à l'alcool varie selon les espèces et les souches bactériennes, mais varie aussi selon les autres paramètres physico-chimiques du vin. L'éthanol est une molécule toxique car elle est capable de s'incorporer à la membrane et de provoquer une fluidité membranaire excessive qui peut être responsable d'une entrée massive de protons et d'une fuite du contenu cytoplasmique. Face à ce stress, divers mécanismes sont mis en jeu par les bactéries pour modifier la composition de la membrane cellulaire. Elles sont notamment capables de synthétiser des protéines chaperonnes, comme Lo18, qui interagissent avec les



**Figure 4. Position phylogénétique de l'espèce *O. oeni*.** Arbre phylogénétique non enraciné construit à partir de l'alignement des séquences d'ADNr 16S d'*O. oeni* et autres bactéries lactiques. (D'après Dicks *et al.*, 1995)

phospholipides et augmentent la rigidité membranaire (Coucheney *et al.*, 2005b ; Weidmann *et al.*, 2010).

L'addition de SO<sub>2</sub> entre 30 – 100 mg/l est utilisée à différents stades de la vinification pour protéger le vin des oxydations biologiques et chimiques, inhiber la croissance de certains microorganismes dans le moût ou stabiliser le vin à la fin des fermentations. Le SO<sub>2</sub> moléculaire entre par diffusion dans la cellule. Il est ensuite converti en ions sulfites responsables de la dénaturation des acides nucléiques et protéines et de l'inhibition de certaines protéines notamment les cofacteurs et les ATPases membranaires provoquant ainsi la mort cellulaire (Carreté *et al.*, 2002). La forme libre du SO<sub>2</sub> est la plus toxique, mais la forme combinée peut également affecter les bactéries car celles-ci sont capables de métaboliser certaines molécules combinées au SO<sub>2</sub> et d'en libérer ainsi une partie (Jackowetz and Mira de Orduña, 2012).

En plus de l'alcool, du pH, du SO<sub>2</sub> ou de la température, le développement bactérien dans le vin peut être limité par divers autres facteurs. Par exemple, l'appauvrissement des ressources nutritives lié à la prolifération des levures lors de la FA, la production d'acide gras aux effets antimicrobiens ou de peptides antibactériens par les levures, la composition phénolique du vin ou la présence de pesticides, sont autant de paramètres capables de compliquer la croissance bactérienne et le déroulement de la FML (Bauer and Dicks, 2004).

## 1.2. L'espèce *Oenococcus oeni*

Dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, divers travaux, comprenant l'" Etude sur les bactéries lactiques du vin " de Peynaud et Domercq (1961), décrivent la présence dans le vin de coques à Gram positif, qui ont été identifiés sous le nom d'espèce *Leuconostoc oenos* en 1967 (Garvie, 1967). Cependant, cette classification a dû être changée suite à la découverte de nombreuses divergences physiologiques et génétiques entre *L. oenos* et les autres membres du genre *Leuconostoc* (Martinez-Murcia and Collins, 1990). En 1995, *L. oenos* est renommée *O. oeni*, première et unique espèce du genre *Oenococcus* (Dicks *et al.*, 1995) (Figure 4). Puis en 2006, *Oenococcus kitaharae*, isolée de résidu de distillat de Shochu, est identifiée comme une nouvelle espèce du genre *Oenococcus* (Endo and Okada, 2006). Malgré une proximité phylogénétique, *O. kitaharae* est très différente d'*O. oeni* dans la



mesure où elle ne partage pas certaines caractéristiques phénotypiques comme le caractère acidophile et la capacité de dégrader l'acide L-malique (Endo and Okada, 2006).

*O. oeni* appartient à la famille des bactéries lactiques, qui est définie comme un groupe de bactéries à Gram positif, anaérobies facultatives, non pathogènes, phylogénétiquement proches, et surtout qui fermentent les hexoses en produisant majoritairement de l'acide lactique. Le métabolisme de ces bactéries a été largement exploité par l'homme pour la préparation et la conservation des aliments tels que les yaourts, fromages, pains, charcuteries, choucroute, cidres et vins. Les bactéries lactiques sont naturellement présentes sur les fruits, légumes et autres végétaux, dans le lait et sur les viandes, et certaines d'entre-elles sont également commensales, colonisant principalement le tractus digestif. La famille des bactéries lactiques regroupe donc de nombreux genres d'importance industrielle dont la majorité appartient aux *Lactobacillales* comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*.

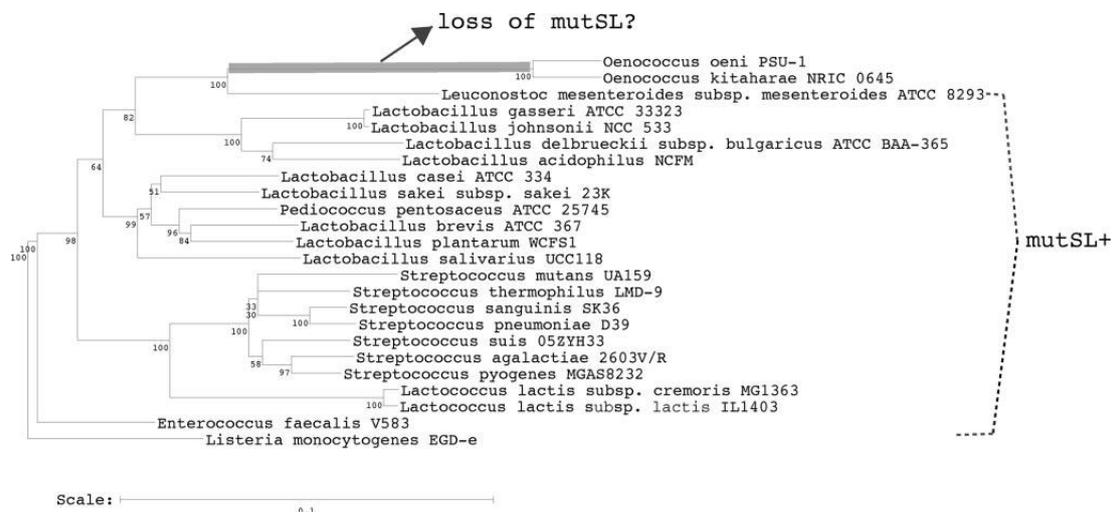
L'espèce *O. oeni* est décrite comme une bactérie en forme de coques, en paire ou en chaînette, acidophile et hétérofermentaire. Elle colonise la surface de certains fruits comme la baie de raisin, la pomme et la poire et participe à l'élaboration des produits dérivés tels que le vin, le cidre et le poiré. Sur la baie de raisin, *O. oeni* cohabite avec de nombreuses autres espèces de bactéries lactiques. Elle y est très minoritaire, ce qui rend sa détection difficile et nécessite souvent une étape d'enrichissement (Renouf, 2006). Au cours de la vinification, la diversité des bactéries lactiques diminue drastiquement et *O. oeni* devient l'espèce majoritaire (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983b ; Fleet *et al.*, 1984 ; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991 ; Renouf *et al.*, 2007). Grâce à une tolérance intrinsèque aux pHs acides du vin (pH 3,0-3,8), aux teneurs élevées en éthanol (10-16%) et aux basses températures (15-20°C), elle est la bactérie la mieux adaptée aux conditions extrêmes qui s'installent lors de la fermentation alcoolique du vin. Pour cette raison, *O. oeni* est généralement considérée comme l'espèce responsable de la FML (Versari *et al.*, 1999 ; Bartowski, 2005). Elle est aussi quasiment la seule espèce sélectionnée et commercialisée comme levain malolactique.



### 1.3. Diversité phénotypique de l'espèce *O. oeni*

Depuis la description de l'espèce, la diversité phénotypique d'*O. oeni* est largement reconnue, notamment concernant les propriétés d'intérêt technologique (Beelman *et al.*, 1980). Malgré le fait qu'*O. oeni* soit la bactérie la mieux adaptée au vin, les souches présentent une grande diversité en terme de capacités à survivre dans le vin, à s'y développer et à mener la FML. Elles sont, en effet, plus ou moins résistantes aux pHs acides, aux teneurs élevées en alcool, aux basses températures ou au SO<sub>2</sub> (Davis *et al.*, 1988 ; Henick-Kling *et al.*, 1989 ; Edwards *et al.*, 1991 ; Sato *et al.*, 2001) ; mais également à bien d'autres facteurs, comme par exemple, les acides gras (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988 ; Renouf and Favier, 2010) ou les bactériophages (Poblet-Icart *et al.*, 1998). Les différences notées dans leur composition en acides gras, leur capacité à assimiler certains d'entre eux (Guerrini *et al.*, 2002a ; Guerrini *et al.*, 2003) ou à synthétiser différents types d'exopolysaccharides (Ciezack *et al.*, 2009 ; Dimopoulou *et al.*, 2012) participent également à la diversité observée concernant les capacités d'adaptation au vin et les activités malolactiques. De plus, les souches d'*O. oeni* présentent des activités métaboliques variables, notamment une activité malolactique plus ou moins efficace (Cappello *et al.*, 2008 ; Cappello *et al.*, 2010 ; Olguín *et al.*, 2010). Certaines d'entre elles sont ainsi capables de terminer la FML en quelques jours, alors que d'autres vont mener à des FML languissantes ou à des arrêts de fermentation.

*O. oeni* présente de nombreux autres traits phénotypiques spécifiques de souches. Par exemple, certaines d'entre elles sont capables de produire des composés indésirables comme les amines biogènes ou le carbamate d'éthyle (Martineau and Henick-Kling, 1995 ; Lonvaud-Funel, 1999). De nombreux travaux visant à étudier l'impact de la FML sur la complexité aromatique du vin ont également montré une diversité des profils aromatiques selon les souches d'*O. oeni* utilisées (Ugliano *et al.*, 2003 ; Ugliano and Moio, 2005 ; Malherbe *et al.*, 2012). Il existe en effet, une variabilité des activités enzymatiques, glycosidases et estérases, impliquées dans la libération de composés aromatiques (Grimaldi *et al.*, 2005 ; Matthews *et al.*, 2007 ; Antalick, 2010 ; Gagné *et al.*, 2010). Cependant, le potentiel aromatique des souches d'*O. oeni* et son impact au cours de la FML est encore un vaste sujet d'études (Bartowsky and Borneman, 2011 ; Perez-Martin *et al.*, 2012 ; Malherbe *et al.*, 2012) et cette caractéristique n'est pas un fait bien établi comme pour les levures



**Figure 5. Présence et absence des gènes *mutS-mutL* chez les bactéries lactiques.** Arbre phylogénétique basé sur les séquences des gènes d'ARNr 16S. (D'après Marcobal *et al.*, 2008)

dont certaines sont d'ailleurs sélectionnées en fonction de ces critères pour mener la FA (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

#### **1.4. Caractéristiques génétiques de l'espèce *O. oeni***

##### Absence des gènes *mutS* - *mutL*

La distance génétique séparant *O. oeni* des leuconostocs est remarquable et suppose qu'il s'agit d'une espèce tachytélique, c'est-à-dire une espèce évoluant rapidement (Yang and Woese, 1989 ; Martinez-Murcia *et al.*, 1993). Longtemps controversée, cette hypothèse est désormais fortement soutenue par l'analyse phylogénétique des premiers génomes de bactéries lactiques et par l'absence des gènes *mutS* – *mutL* dans le génome d'*O. oeni* et d'*O. kitaharae* (Mills *et al.*, 2005 ; Makarova and Koonin, 2007 ; Marcobal *et al.*, 2008) (Figure 5). Les gènes *mutS* – *mutL* codent des enzymes du système MMR (DNA Mismatch Repair), système de correction par excision des mésappariements de bases. Il intervient dans la régulation du taux de mutation spontanée et de recombinaison inter-espèces. L'absence ou la mutation de ce système est très rare. Elle est corrélée à une diversité génétique élevée et à un caractère hypermutable des espèces étudiées (Prunier and Leclercq, 2005). Marcobal *et al.* (2008) associent l'absence des gènes *mutS* - *mutL* au caractère hypermutable du génome d'*O. oeni*. Ils suggèrent, plus largement, que cette caractéristique serait à l'origine d'une évolution et d'une adaptation rapide du genre *Oenococcus* à une niche environnementale particulière.

##### Diversité génétique controversée

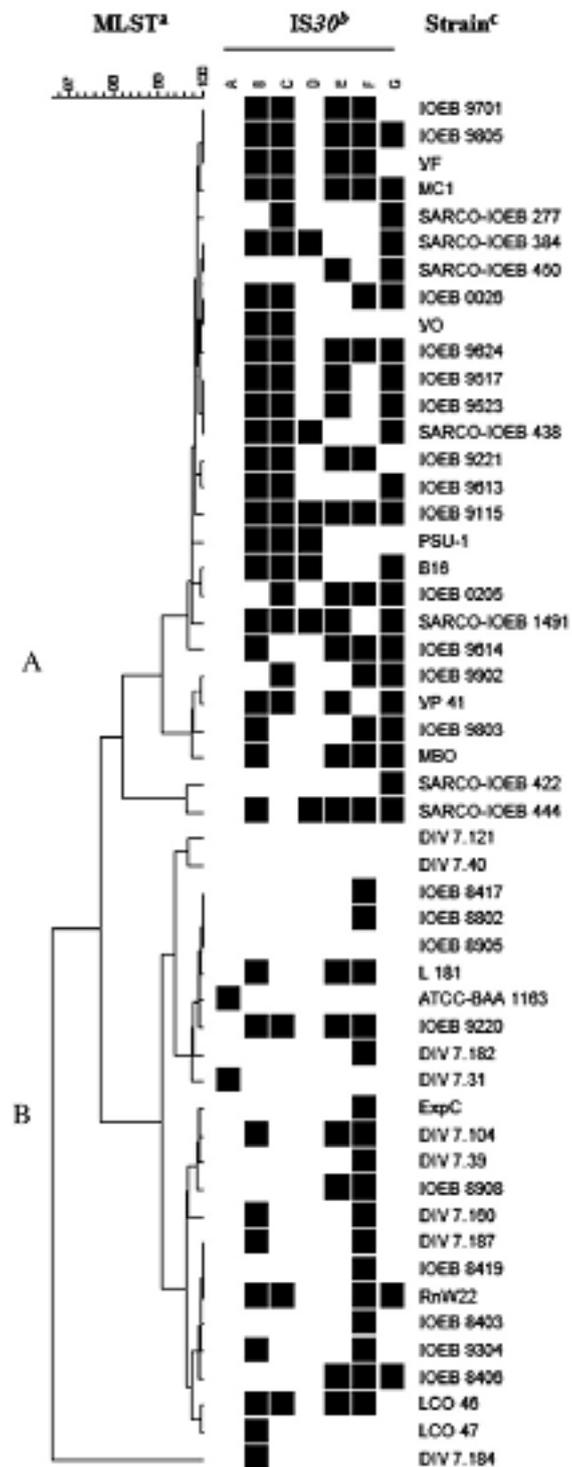
A l'ère de la biologie moléculaire, de nombreux travaux ont été initiés pour comprendre la diversité intra et inter-espèces. Différentes démarches ont été entreprises pour étudier le polymorphisme des souches d'*O. oeni* et ont abouti à des conclusions souvent opposées. Certaines analyses basées sur le séquençage de l'ADNr 16S et de l'espace inter-génique des ADNr 16S-23S (Yang and Woese, 1989 ; Zavaleta *et al.*, 1996 ; Le Jeune and Lonvaud-Funel, 1997), la technique RFLP (Viti *et al.*, 1996) et la PCR RAPD (Zavaleta *et al.*, 1997 ; Lechiancole *et al.*, 2006) n'ont pas ou peu permis de différencier les souches d'*O. oeni* étudiées, ce qui suggère qu'il s'agit d'une espèce relativement homogène. A l'inverse,



d'autres auteurs ont développé des outils comme la PCR RAPD, la technique de REA PFGE, ou les analyses MLST et VNTR leur permettant de discriminer un grand nombre de souches d'*O. oeni* et de décrire *O. oeni* comme une espèce hétérogène (Kelly *et al.*, 1993 ; Zapparoli *et al.*, 2000 ; de Las Rivas *et al.*, 2004 ; López *et al.*, 2007 ; Larisika *et al.*, 2008 ; Marcobal *et al.*, 2008 ; Claisse and Lonvaud-Funel, 2012). Ces controverses sont notamment liées au choix de la méthode basée soit sur la phylogénie (MLST, séquençage de l'ADNr 16S, etc) soit sur des caractéristiques génomiques particulières (RAPD, PFGE, VNTR, etc), mais aussi au choix des souches analysées (nombre, origines géographiques et environnementales, etc) (Guerrini *et al.*, 2003 ; Lechiancole *et al.*, 2006). Des études récentes basées sur l'analyse MLST d'un grand nombre de souches d'*O. oeni* montrent une diversité génétique modérée comparée à d'autres espèces de bactéries lactiques et proposent une évolution de l'espèce essentiellement liée à des phénomènes de recombinaison inter-génique (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010).

#### Existence de deux sous-populations d'*O. oeni*

Depuis les premières caractérisations de l'espèce *O. oeni*, des divergences physiologiques ont été constatées et la distinction de deux espèces différentes a déjà été proposée par Peynaud et Domercq (1968). Cependant, les pourcentages d'hybridation ADN-ADN soutiennent fortement le concept d'espèce unique (Dicks *et al.*, 1995). Aujourd'hui, des analyses génétiques confortent l'existence de deux sous-populations génétiques composant l'espèce *O. oeni*. En effet, cette observation a souvent été rapportée lors de travaux de caractérisation génétique basés sur diverses méthodes de typage moléculaire comme la PCR RAPD (Zavaleta *et al.*, 1997), la technique REA PFGE (Larisika *et al.*, 2008), l'analyse MLST (de Las Rivas *et al.*, 2004 ; Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010) et plus récemment l'analyse VNTR (Claisse and Lonvaud-Funel, 2012). Lors de récents travaux, deux groupes génétiques majeurs, A et B, ont été mis en évidence, contenant chacun des sous-groupes dont l'existence semble corrélée à l'origine géographique des souches et/ou au type de produit d'où elles ont été isolées (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010). Par exemple, les souches isolées du cidre appartiennent exclusivement au groupe génétique B ; d'autres souches provenant du Chili ou de la région champenoise forment des sous-groupes nettement distincts à l'intérieur du groupe génétique A (Bridier *et al.*, 2010). Evoquée par Tenreiro *et al.* (1994), la notion de sous-espèces est appuyée par les résultats issus de l'analyse MLST de



**Figure 6.** Contenu en éléments IS30 des deux "sous-populations" A et B de l'espèce *O. oeni*. L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences MLST de 7 loci et 7 éléments IS30 ont été recherchés par PCR spécifique. (D'après El Gharniti *et al.*, 2012)

282 souches d'*O. oeni* (Bridier *et al.*, 2010). Aucun évènement de recombinaison entre les sous-populations A et B n'a été mis en évidence pour les 7 gènes analysés, chacun possédant ses propres allèles. Ces observations suggèrent que les deux groupes phylogénétiques évoluent séparément et échangent peu de matériel génétique. La différence de niche environnementale, les souches de cidre appartenant exclusivement au groupe B (Bridier *et al.*, 2010), concorde avec cette idée ; de même que la variation du contenu en éléments transposables IS30 de ces deux " sous-espèces " (El Gharniti *et al.*, 2012) (Figure 6).



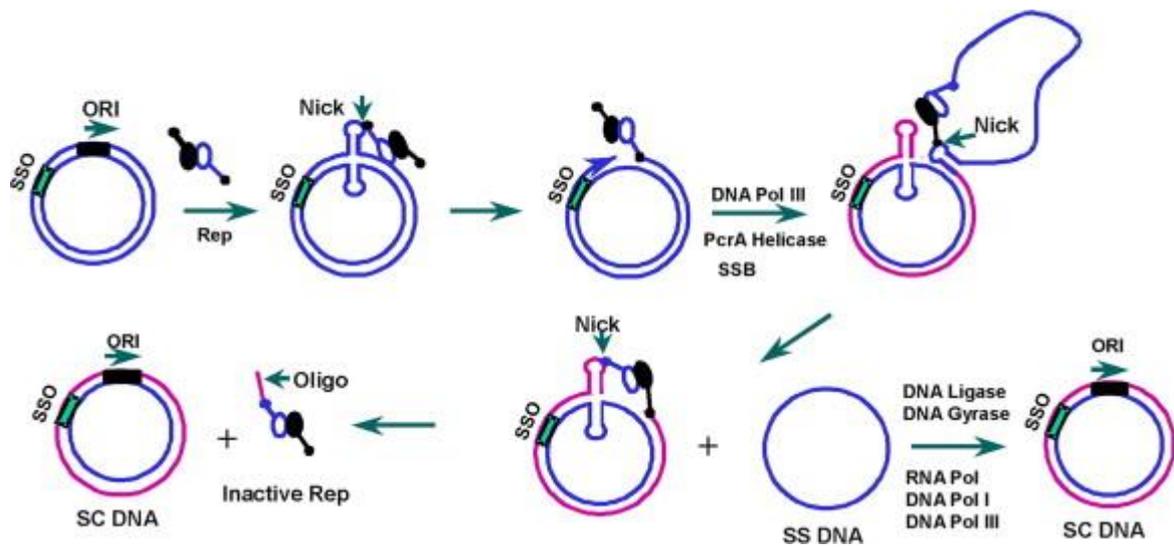
## 2. L'analyse des plasmides et génomes d'*O. oeni*

### 2.1. Les plasmides des bactéries lactiques

#### 2.1.1. Définition

Les plasmides ont été découverts dans les années 1940 par le biologiste Joshua Lederberg. Il observa des phénomènes de transferts génétiques entre les souches d'*Escherichia coli* et suggéra que ces gènes transférés n'étaient pas portés par le chromosome mais plutôt par une molécule d'ADN extrachromosomique (Lederberg and Tatum, 1946). Ces éléments extrachromosomiques sont aujourd'hui considérés comme une source importante de diversité phénotypique et génétique intra et inter-espèces via le transfert de gènes. Ils contribuent à l'adaptation des microorganismes et portent parfois des traits phénotypiques singuliers d'intérêt industriel.

Les plasmides sont présents dans les trois domaines du vivant. Majoritairement rencontrés et étudiés chez les procaryotes, certaines cellules eucaryotes portent ces éléments comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* et son plasmide 2 $\mu$  (Livingston, 1977). Chez de nombreuses *Archaea*, ils représentent parfois jusqu'à 25% du contenu génétique cellulaire (del Solar *et al.*, 1998). Par définition, les plasmides sont des molécules d'ADN extrachromosomiques facultatives, de forme circulaire, parfois linéaire, variant en taille et en nombre de copies. Leur taille (1 à >100kb) est souvent inversement proportionnelle au nombre de copies présent dans la cellule. Ils peuvent être présents en un ou deux exemplaires dans la cellule hôte (cas des mégaplasmides) et jusqu'à plusieurs dizaines de copies pour les petits plasmides. Ces éléments extrachromosomiques sont doués de réplication autonome, assurent leur transfert vertical de la cellule mère aux cellules filles et pour certains, leur transfert horizontal d'une cellule à une autre au sein de la même espèce ou entre espèces différentes. Leur fonction première est d'assurer leur réplication de façon autonome mais ils codent aussi divers mécanismes participant à la stabilité plasmidique et des fonctions accessoires. Certains plasmides adoptent un mode de vie parasitaire exploitant la fonction de l'hôte pour leur réplication et leur transfert ; ils représentent parfois une charge pour la cellule (Driss *et al.*, 2011). D'autres sont plutôt mutualistes, confèrent des



**Figure 7. Réplication par cercle roulant.** Bleu, ADN matrice ; rose, brin néosynthétisé. (D'après Khan, 2005)

avantages adaptatifs à la cellule hôte et assurent la diffusion de gènes d'intérêt par transfert horizontal (Siezen *et al.*, 2005).

### 2.1.2. Réplication, stabilité et conjugaison

#### Mécanisme de réplication

La réplication est une fonction essentielle à la " survie " des plasmides assurant leur multiplication et conditionnant également les mécanismes de ségrégation et de régulation du nombre de copies. Le développement et l'utilisation des plasmides comme vecteur de clonage ont nécessité d'étudier en détails ces mécanismes. Trois modes de réplication se distinguent chez les plasmides circulaires : la réplication par cercle roulant, la réplication par mécanisme  $\theta$  et la réplication par déplacement de brin.

**Cercle roulant.** La réplication par cercle roulant est un mécanisme unidirectionnel, asynchrone et séquentiel qui fait intervenir de nombreuses protéines de la cellule hôte (ADN polymérase, hélicase, ligase, ARN polymérase, etc.). Le réplicon - nom donné à l'unité responsable de la réplication - est composé d'une protéine de réplication Rep à activité endonucléase-ligase site-spécifique et de deux origines de réplication : simple (*ss*) et double brin (*ds*). La réplication est initiée par la protéine Rep qui crée une coupure simple brin au niveau d'un site spécifique de la séquence *ds*. L'extrémité 3'-OH libérée est alors utilisée comme amorce pour la réplication. L'élongation se déroule en continu le long de l'ADN circulaire déplaçant le brin sens jusqu'à atteindre de nouveau la séquence *ds*. L'intermédiaire simple brin ainsi formé est ensuite converti en ADN double brin ; la protéine Rep coupe le brin sens au niveau de son origine de réplication *ss* et l'ADN polymérase cellulaire synthétise le brin retardé complémentaire formant une nouvelle molécule d'ADN double brin (Figure 7). La réplication par cercle roulant est surtout associée aux plasmides des bactéries à Gram positif, mais ceux de certaines bactéries à Gram négatif, cyanobactéries ou *Archaea* utilisent aussi ce mode de réplication. Enfin, la réplication par cercle roulant est essentiellement décrite chez des plasmides de petite taille <10kb, mais tous les petits plasmides ne se répliquent pas forcément via ce mécanisme (Solar *et al.*, 1993 ; del Solar *et al.*, 1998).



**Mécanisme *thêta*.** Le mécanisme *thêta* est utilisé également par les chromosomes bactériens. Il nécessite la séparation des deux brins d'ADN par une hélicase, la synthèse d'une amorce ARN et l'initiation de la réplication par élongation de cette amorce. La synthèse des brins d'ADN est uni ou bidirectionnelle, continue sur le brin sens et discontinue sur le brin antisens. Le réplicon des plasmides *thêta* se compose d'une protéine initiatrice de réplication Rep et d'une origine de réplication *ori*. L'*ori* correspond à une région spécifique de chaque réplicon, riche en bases AT, contenant des séquences répétées en tandem (itérons) impliquées dans l'initiation et la régulation de la réplication (Rajewska *et al.*, 2011). De façon générale, le mécanisme *thêta* débute par le regroupement de l'ensemble des protéines impliquées dans la réplication (protéines Rep, protéines DnaA, ADN polymérase, hélicase, etc.) au niveau de l'*ori* et par la formation d'un complexe nucléoprotéique entre la protéine Rep et le site de liaison spécifique de l'*ori*. Ce complexe associé à la protéine initiatrice de la réplication (DnaA) de la cellule hôte facilite la réquisition d'une hélicase cellulaire et l'ouverture des deux brins d'ADN au niveau de la région riche en AT. La synthèse continue du brin sens, et discontinue du brin retardé, peut alors débiter au niveau de l'amorce ARN via l'ADN polymérase. Les intermédiaires de réplication forment des molécules typiques en forme de "  $\theta$  ". A la fin de la réplication, des topoisomères sont ainsi générés (del Solar *et al.*, 1998).

**Déplacement de brin.** La réplication par déplacement de brin est associée à un type de plasmides à large spectre d'hôtes de la famille IncQ. Elle requiert trois protéines : une hélicase (RepA), une primase (RepB) et une protéine d'initiation de la réplication (RepC), et une origine de réplication riche en AT contenant des itérons, les sites de liaison de RepC et deux séquences palindromiques reconnues par la primase RepB. Après la dénaturation de l'origine de réplication grâce aux protéines RepC et RepA, la protéine RepB intervient pour synthétiser des amorces ARN. La synthèse continue de chacun des brins par une polymérase cellulaire se traduit par le déplacement des brins complémentaires. La réplication des ADN simple brin formés est initiée au niveau d'une séquence spécifique de l'origine de réplication. Ce mécanisme ne nécessite pas l'intervention des facteurs de transcription et de réplication de la cellule hôte (del Solar *et al.*, 1998). Cette indépendance pourrait expliquer le large spectre d'hôtes des réplicons IncQ.



### Systeme de maintenance

La stabilité plasmidique est étroitement liée au mode de répllication. Chez *Lactococcus lactis*, il a été montré que les plasmides de type thêta étaient plus stables que ceux à répllication par cercle roulant (Kiewiet *et al.*, 1993). En effet, ces derniers sont soumis à une forte instabilité ségrégationnelle liée à la formation de nombreux intermédiaires d'ADN simple brin favorisant la formation par recombinaison homologue de plasmides multimères (Mills *et al.*, 2006 ; Field and Summers, 2011). La formation de multimères diminue le nombre d'unités totales et augmente ainsi la probabilité de produire une cellule fille sans copie plasmidique. Cependant, les plasmides à cercle roulant en majorité de petite taille se trouvent souvent en nombre de copies élevé diminuant la probabilité d'obtenir une cellule fille sans plasmide. Au contraire, la stabilité des plasmides à faible nombre de copies nécessite l'intervention de divers mécanismes assurant leur transfert vertical vers les cellules filles. Ces systèmes de maintenance impliquent : (i) le mécanisme de recombinaison site-spécifique reconstituant un réplicon fonctionnel après la répllication et diminuant la formation de plasmides multimères, (ii) des mécanismes de partition qui permettent une ségrégation mécanique et uniforme des plasmides (Schumacher, 2011) et (iii) des systèmes d'addiction responsables de la mort post-ségrégationnelle des cellules n'ayant pas acquis de plasmides (Gerdes *et al.*, 1986).

### Transfert par conjugaison

Les plasmides participent à la diversité génétique et phénotypique intra et inter-espèces via le transfert horizontal de gènes. La dissémination du matériel génétique est assurée par le phénomène de conjugaison bactérienne, propriété codée par de nombreux plasmides. Lors de la conjugaison, une molécule d'ADN simple brin formée par hydrolyse de l'origine de transfert portée par le plasmide est transférée d'une bactérie donneuse à une bactérie réceptrice grâce à un complexe protéique reliant les deux cellules. Chez les bactéries à Gram négatif, le contact cellulaire est assuré par la formation d'un pilus sexuel, complexe de filaments extracellulaires (Grohmann *et al.*, 2003). Ce processus reste encore imprécis chez les bactéries à Gram positif. La circularisation et la synthèse du brin complémentaire de l'ADN simple brin est ensuite assurée dans la cellule réceptrice. Sur le plan moléculaire, le transfert conjugal nécessite une origine de transfert *oriT*, l'intervention



d'un large panel de gènes plasmidiques regroupés en cluster, nommé *tra* et la participation de certaines protéines de la cellule hôte (Dougherty *et al.*, 1998 ; Ito *et al.*, 2009). Chez *Lactococcus lactis*, la région conjugative du plasmide pMRC01 correspond à un opéron d'environ 15kb constitué de 16 gènes impliqués dans la formation du complexe permettant le contact cellulaire, la réplication et la mobilisation de l'ADN (Dougherty *et al.*, 1998). Enfin, les plasmides conjugatifs ont aussi la capacité de transférer d'autres éléments génétiques mobilisables. C'est le cas des plasmides à réplication par cercle roulant, souvent non conjugatif de part leur petite taille, qui codent des protéines de mobilisation et de transfert (Alegre *et al.*, 1999 ; Asteri *et al.*, 2010).

### 2.1.3. Distribution et fonctions accessoires des plasmides

#### Des éléments fréquents codant des propriétés d'intérêt

Chez les bactéries lactiques, les plasmides sont des éléments courants. Parmi 65 espèces de lactobacilles, au moins 25 d'entre elles contiennent des plasmides natifs, soit 38% des espèces (Wang and Lee, 1997). La plupart des plasmides de lactobacilles ont une taille inférieure à 10kpb (kilo paires de bases). Cependant, il existe aussi des mégaplasmides (>100kpb) identifiés notamment chez l'espèce *Lactobacillus salivarius* (Li *et al.*, 2007). En effet, des mégaplasmides de 100 à 380kpb ont été identifiés parmi 23 souches de cette espèce. Ils sont caractérisés par une zone de réplication très conservée et codent, pour la plupart, des propriétés métaboliques telles que l'utilisation du rhamnose, du sorbitol et du ribose, ainsi que la production d'une bactériocine. Concernant les lactocoques, Mills *et al.* (2006) a répertorié, en 2005, l'existence de 26 plasmides totalement séquencés. Enfin, les bactéries lactiques peuvent contenir un ou plusieurs plasmides différents, jusqu'au nombre de 16 chez une souche de *Lactobacillus plantarum* (Ruiz-Barba *et al.*, 1991).

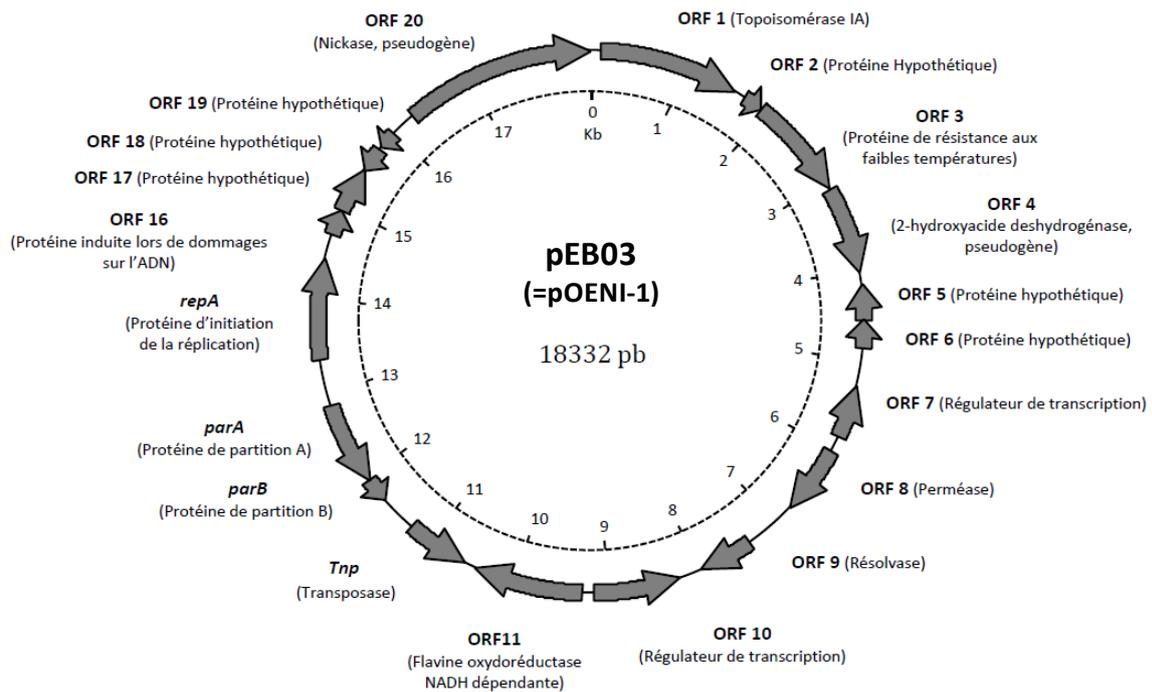
La large distribution des plasmides chez les bactéries lactiques ainsi que la diversité des fonctions associées sont aujourd'hui des faits bien établis. Dans l'industrie laitière, ces éléments tiennent une place prépondérante lors de la sélection des levains lactiques. En effet, ils codent de nombreuses propriétés nécessaires à l'adaptation des souches à cette niche écologique et indispensables à la fermentation du lait (Siezen *et al.*, 2005). Selon Mills *et al.* (2006), la présence de plasmides chez les souches commerciales serait une signature



de leur spécificité et de leur supériorité technologique. Chez *Lactococcus lactis*, la perte spontanée de la capacité à fermenter le lactose a été associée à la présence d'un plasmide codant une phospho- $\beta$ -galactosidase (Mills *et al.*, 2006). Les souches industrielles portant cette enzyme plasmidique fermentent plus rapidement le lactose que les autres souches dégradant le lactose via une  $\beta$ -galactosidase chromosomique. Ce trait phénotypique est ainsi devenu un des principaux critères de sélection des levains lactiques. La présence de plasmides chez les bactéries lactiques a été associée à de nombreuses autres caractéristiques comme la résistance aux bactériophages, antibiotiques et métaux lourds, la production de bactériocines, protéases et exopolysaccharides, et certaines fonctions associées au métabolisme énergétique (utilisation des sucres, des acides aminés, du citrate) (Wang and Lee, 1997 ; Mills *et al.*, 2006). A propos des bactéries du vin, le caractère instable de la production d'histamine a été attribué à la présence d'un plasmide chez les espèces *Lactobacillus hilgardii* et *Oenococcus oeni* (Lucas *et al.*, 2005 ; Lucas *et al.*, 2008). Une souche de *Pediococcus pentosaceus* isolée du vin porte également un plasmide nommé pRS5 se répliquant via le mécanisme  $\theta$  et codant un potentiel système de résistance aux phages (Alegre *et al.*, 2009).

#### Cas de l'espèce *O. oeni*

La fréquence et l'intérêt technologique des plasmides chez les bactéries lactiques est donc un fait établi et incontestable. Cependant, il n'existe que très peu d'informations concernant le contenu plasmidique de l'espèce *O. oeni*. Les premiers travaux relatant la présence de plasmides chez *O. oeni* datent de la fin des années 1980 (Janse *et al.*, 1987). Onze plasmides de taille comprise entre 2,4 et 4,6 kpb ont été détectés chez seulement huit souches parmi 42 analysées. En accord avec ces résultats, de nombreux auteurs observent un faible contenu plasmidique chez *O. oeni* par rapport aux autres bactéries lactiques et estiment que l'information génétique extrachromosomique est extrêmement limitée chez cette espèce (Orberg and Sandine, 1984 ; Cavin *et al.*, 1988 ; Fremaux *et al.*, 1993 ; Kelly *et al.*, 1993 ; Prevost *et al.*, 1995 ; Zavaleta *et al.*, 1997 ; Mesas *et al.*, 2011). La faible stabilité des plasmides en condition de laboratoire, les difficultés rencontrées pour extraire les plasmides d'*O. oeni* et des méthodes de détection inadaptées pourraient être à l'origine d'une sous-estimation de leur nombre (Brito and Paveia, 1999 ; Mesas *et al.*, 2004 ; Bilhère, 2009). En effet, suite à plusieurs échecs lors de la purification des plasmides en petite



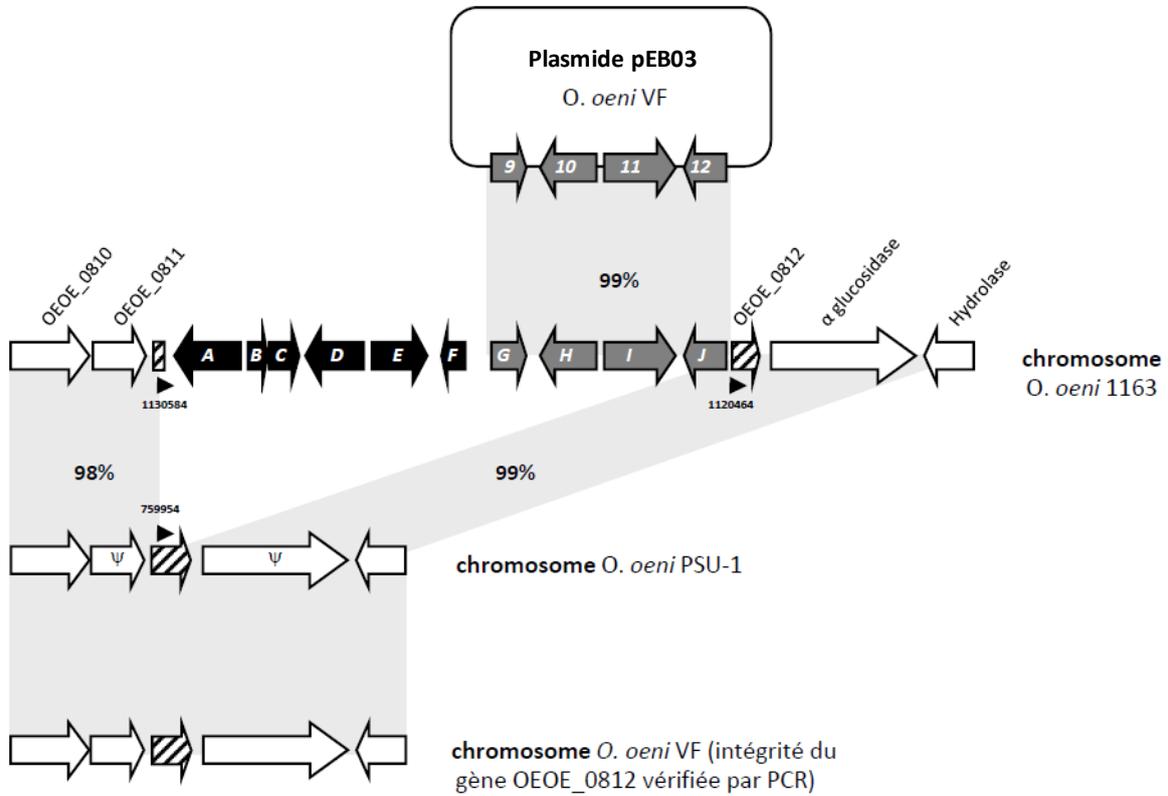
**Figure 8. Carte génétique du plasmide pEB03 isolé de la souche VF.** Dans la section " Résultats et discussion ", le plasmide pEB03 a été renommé pOENI-1. (D'après Bilhère, 2009)

volume, la présence de petits et grands ( $\approx 40\text{kb}$ ) plasmides chez plus de 75% des souches analysées a été détectée grâce à une extraction réalisée sur trois litres de culture (Brito and Paveia, 1999). La présence de grands plasmides a été observée chez de nombreuses souches (Sgorbati *et al.*, 1985 ; Sgorbati *et al.*, 1987 ; Prevost *et al.*, 1995 ; Brito and Paveia, 1999 ; Lucas *et al.*, 2008). Mais jusqu'en 2009, seulement sept petits plasmides cryptiques, ne codant que des fonctions de répllication et de mobilisation, ont été séquencés et décrits : pLo13 (3948pb), pOg32 (2544pb), pRS1 (2523pb), pRS2 (2544pb), pRS3 (3948pb), p4028 (4410pb) et pOM1 (3926pb, séquence non publiée) (Fremaux *et al.*, 1993 ; Brito *et al.*, 1996 ; Zuniga *et al.*, 1996 ; Alegre *et al.*, 1999 ; Mesas *et al.*, 2001). Les cinq premiers sont des plasmides se répliquant par cercle roulant, codant 3 phases de lecture ouvertes (ORFs, Open Reading Frames) et partageant de fortes homologues de séquences. Mesas *et al.* (2001) suggèrent l'existence d'une famille de petits plasmides cryptiques chez *O. oeni* composée d'une sous-famille avec pRS1, pRS2 et pOg32 et d'une autre contenant pLo13 et pRS3. Le plasmide p4028, codant 5 ORFs, est différent et pourrait se répliquer via un mécanisme  $\theta$ . Très récemment, les bases de données ont été enrichies par l'ajout de plusieurs génomes d'*O. oeni* dont certains semblent contenir des séquences plasmidiques (Borneman *et al.*, 2012a). Excepté les mécanismes de répllication et de transfert, peu de fonctions accessoires ont été décrites chez les plasmides d'*O. oeni* (Sgorbati *et al.*, 1987). Seul le gène *hdca* codant une histamine décarboxylase a été localisé sur un plasmide d'*O. oeni* (Lucas *et al.*, 2008). Un grand plasmide nommé pEB03 et séquencé au laboratoire en 2009 contient des gènes accessoires susceptibles de coder des fonctions d'intérêt (Bilhère, 2009).

#### 2.1.4. pEB03, le premier grand plasmide $\theta$ séquencé chez *O. oeni*

##### Description du pEB03

Lors des travaux de Bilhère (2009), un plasmide de grande taille nommé pEB03 a été isolé de la souche d'*O. oeni* commercialisée comme levain malolactique sous le nom Vitilactic F (VF, Martin Vialatte). Il a été séquencé afin de déterminer son éventuelle contribution dans l'adaptation au vin. Ce plasmide à faible nombre de copies (3 à 5 copies/cellules) est une molécule d'ADN circulaire de 18322pb (Figure 8). Il a un pourcentage en bases GC de 40,8% ; par comparaison, celui des génomes d'*O. oeni* PSU-1 et ATCC BAA 1163 est de 38%. L'annotation de la séquence ADN a révélé la présence de 18 ORFs putatives



**Figure 9. Élément mobile de quatre gènes communs au plasmide pEB03 (=pOENI-1) et à une région chromosomique de la souche ATCC BAA 1163.** Les quatre gènes communs à pEB03 et à ATCC BAA 1163 sont indiqués par les flèches en gris clair. L'îlot de 10kpb détecté sur le génome de ATCC BAA 1163 est représenté par les flèches notées de A à J. Il est inséré au niveau du gène OE0E\_0812 (flèche hachurée), lequel est intègre chez les souches PSU1 et VF. (D'après Bilhère, 2009)

et 2 ORFs tronquées codant probablement des protéines non fonctionnelles (ORFs 4 et 20). Une fonction protéique a été prédite pour quatorze d'entre elles. La protéine de réplication (ORF 15) présente 69% de similarité de séquence avec la protéine RepA porté par le plasmide thêta de *Lactobacillus salivarius* (Fang *et al.*, 2008). La détection d'une séquence en amont du gène, riche en bases AT et contenant des itérons, est aussi une caractéristique en faveur d'un plasmide à réplication thêta. Il a également été identifié un système de partition susceptible d'assurer la ségrégation uniforme des copies plasmidiques entre les cellules filles au cours de la division bactérienne (ORFs 13 et 14). Malgré la présence de deux gènes fonctionnels impliqués dans le mécanisme de conjugaison (ORFs 1 et 3), ce plasmide ne contient pas l'ensemble des gènes nécessaires à un système conjugatif fonctionnel. Un groupe de quatre gènes identifiés sur pEB03 (ORFs 9, 10, 11 et 12) a également été détecté sur le chromosome de la souche ATCC BAA 1163 inséré au niveau du gène OE0E\_0812 (Figure 9).

D'un point de vue fonctionnel, l'ORF 11 code pour une flavine oxydoréductase NADH dépendante de la famille " Old Yellow Enzyme ". Ce type d'enzyme utilise généralement un cofacteur de type FMN et un NADH ou NADPH comme source d'électrons pour réduire diverses molécules  $\alpha,\beta$  insaturés, telles que les composés phénoliques (Williams and Bruce, 2002). Des travaux suggèrent la participation de ces enzymes dans la réponse au stress oxydatif, la détoxification cellulaire ou la mort cellulaire programmée (Fitzpatrick *et al.*, 2003 ; Brige *et al.*, 2006 ; Odat *et al.*, 2007). Toutefois, le substrat naturel et le rôle physiologique des enzymes OYE reste encore imprécis.

#### Distribution et analyse fonctionnelle de pEB03

Afin d'évaluer la distribution de pEB03 au sein de l'espèce *O. oeni*, une collection de 43 souches a été analysée par différentes PCR ciblant deux gènes plasmidiques, *repA* et *oye*, et un gène chromosomique, OE0E\_0812. Les résultats ont montré que sept souches étaient susceptibles de porter le plasmide pEB03 soit 17,5% de la collection (Bilhère, 2009). Parmi les 33 autres souches, 14 ne contenaient pas la base répliquative de type pEB03 (PCR *repA* négative), mais présentaient le gène *oye* en dehors du locus intégré dans le gène OE0E\_0812 comme chez la souche ATCC BAA 1163 (Figure 9).



Malgré l'absence de fonction d'intérêt évidente, la souche commerciale VF a conservé ce plasmide lors des procédés de production industrielle. Par conséquent, pEB03 doit conférer un certain avantage à la bactérie. L'étude fonctionnelle de pEB03 a nécessité de créer un mutant de la souche VF dépourvue du plasmide. La perte du plasmide a été obtenue spontanément en condition de laboratoire, ceci suggérant une certaine instabilité (Bilhère, 2009). La capacité à se développer des deux souches VF avec ou sans plasmide a été comparée en présence de différents stress (pH, éthanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et directement dans le vin. Néanmoins, les résultats n'ont pas permis d'attribuer un rôle physiologique au plasmide dans les conditions testées (Bilhère, 2009).

## **2.2. Les génomes des bactéries lactiques**

### **2.2.1. Evolution des techniques de séquençage**

Depuis une dizaine d'année, le séquençage des génomes est devenu une approche incontournable pour les études de diversité génétique, de génomique comparative, d'écologie microbienne et de biologie en général. Traditionnellement, le séquençage de l'ADN était réalisé par la méthode de Sanger, qui permet d'obtenir des fragments d'environ 1000pb et un faible taux d'erreur, de l'ordre de 10<sup>-5</sup> par base (Sanger *et al.*, 1977). Très récemment, cette méthode a été partiellement supplantée par les technologies de séquençage haut-débit, de nouvelle génération, qui ouvrent de nouveaux champs d'investigation et de nouvelles applications. Ces techniques reposent sur les mêmes principes généraux que la méthode de Sanger. Le progrès qui leur incombe repose essentiellement sur les capacités de séquençage à haut-débit et sur le développement d'outils bioinformatiques permettant l'analyse d'une masse de données importante. Ces technologies ont permis d'améliorer à la fois la vitesse et le coût du séquençage des génomes. Pour exemple, le séquençage du premier génome humain a nécessité une quinzaine d'années et a coûté environ deux milliards d'euros, alors qu'aujourd'hui, 1000 euros et quelques jours suffisent.



### Séquençage de 1<sup>ère</sup> génération : séquençage par la méthode Sanger

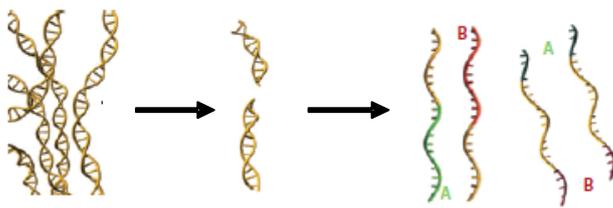
Le séquençage par la méthode Sanger a été développé il y a plus de 30 ans par Sanger *et al.* (1977), puis quelques améliorations ont été apportées. Cette technique repose sur la synthèse du brin complémentaire de la matrice cible à l'état simple brin et sur l'incorporation aléatoire d'un didésoxynucléotide entraînant l'arrêt de l'élongation. Cela génère un ensemble de molécules de tailles différentes représentant l'ensemble des positions pour chacune des bases. Anciennement, la réalisation de quatre réactions de séquençage comprenant chacune un des quatre didésoxynucléotides permettait la différenciation des bases. La taille des fragments était ensuite déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose. Aujourd'hui, l'utilisation de didésoxynucléotides marqués par un fluorophore de couleur différente permet de réduire le séquençage de l'ADN à une réaction unique. De plus, cette technique a pu être entièrement automatisée grâce au développement de séquenceur où se déroule la réaction de séquençage, la migration des fragments par électrophorèse capillaire et l'acquisition informatique des données.

### Séquençage de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération : séquençage à haut-débit

Les techniques de séquençage à haut-débit de nouvelle génération impliquent le séquençage massif et simultané d'une molécule d'ADN dans un système miniaturisé. Diverses approches sont proposées par différents groupes comme Roche, Illumina et Life Technologies.

Le séquençage de 2<sup>ème</sup> génération repose sur une réaction de séquençage avec amplification de l'ADN initial. La première approche commercialisée est la technologie de séquençage 454 (Roche Applied Sciences). Elle est construite sur l'intégration de plusieurs techniques : la PCR en émulsion, le pyroséquençage, les plaques en fibre de verre picotitrée ainsi que des technologies de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des données. Le séquençage 454 se déroule en quatre étapes principales (Figure 10) :

**(i) Préparation de la librairie d'ADNs**



- Fragmentation des génomes par nébulisation
- Ligation des adaptateurs A et B
- Sélection des fragments d'ADN simple brin A/B par purification streptavidine- biotine

**ADNg** → **Librairie d'ADNs**

**(ii) Amplification des ADNs par PCR en émulsion**



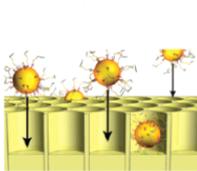
- Hybridation des ADNs aux microbilles

- Formation des microréacteurs contenant les billes et les réactifs PCR par émulsion
- Amplification clonale de chaque ADNs contenu dans un microréacteur

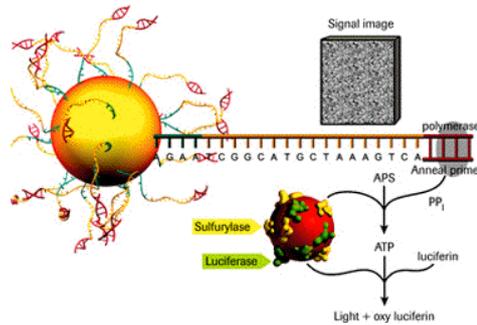
- Purification et enrichissement des billes contenant des ADN

**Librairie d'ADNs** → **Librairie d'ADNs amplifiés**

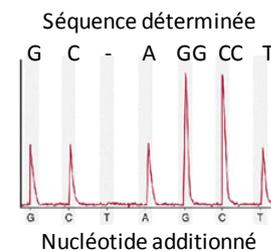
**(iii) Réaction de séquençage**



- Plaque de séquençage picotitrée
- Dépôt 1 bille / puit



- Réaction de pyroséquençage : émission d'une fluorescence à chaque incorporation d'une base



- Visualisation des séquences sous forme de pyrogramme
- Acquisition et traitement informatique des données

**Librairie d'ADNs amplifiés** → **Détermination des séquences**

**Figure 10. Principales étapes de la technologie de séquençage 454. (Adapté de Mardis, 2008)**

(i) **Préparation d'une banque d'ADN simple brin.** Tout d'abord, l'ADN génomique est fragmenté mécaniquement par nébulisation. Les fragments obtenus ont généralement une taille moyenne de 550pb  $\pm$  250pb. Deux adaptateurs A et B indispensables lors des étapes suivantes sont ligaturés aux extrémités de chaque fragment. L'adaptateur B biotinylé permet, lors des étapes de purification et dénaturation, de sélectionner uniquement les molécules d'ADN simple brin bornées par un adaptateur A et un adaptateur B.

(ii) **Amplification clonale des molécules d'ADN simple brin.** Chaque fragment d'ADN simple brin est fixé à des microbilles portant en surface des amorces spécifiques d'un des deux adaptateurs. Les billes sont ensuite introduites dans une émulsion contenant l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction PCR et permettant d'isoler chacune d'entre elles. A l'intérieur de chaque microréacteur formé, l'unique fragment d'ADN est amplifié.

(iii) **Réaction de pyroséquençage en plaque picotitrée.** Après amplification, les billes sont déposées sur une plaque en fibre de verre picotitrée contenant 1,6 millions de puits. Le diamètre des puits assure le dépôt d'une seule bille. Ce système permet d'effectuer jusqu'à 400 000 réactions en parallèle. Lors du pyroséquençage, les quatre dNTPs sont incorporés de manière séquentielle dans une chambre de réaction et d'acquisition. Le principe de la réaction repose sur l'émission d'une fluorescence à chaque incorporation d'un dNTP. Leur intégration provoque la libération de pyrophosphate inorganique qui sera transformé par une ATP sulphurylase en ATP. La molécule d'ATP en présence de luciférine est utilisée par une luciférase pour produire de l'oxyluciférine et un signal lumineux.

(iv) **Acquisition et traitement des données.** Chaque signal émis est capturé par une caméra puis reproduit sous forme d'un pyrogramme. La hauteur des pics obtenus est proportionnelle à l'intensité lumineuse du signal, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. Ainsi, l'analyse du pyrogramme permet de déduire facilement la séquence d'ADN.

La technologie Illumina Genome Analyzer (Illumina), également très répandue aujourd'hui, repose, comme la technologie 454, sur l'amplification de l'ADN initial avec quelques variantes dans les techniques utilisées. L'approche Illumina intègre une amplification de l'ADN directement sur la plaque de séquençage où sont fixés les adaptateurs nécessaires à la PCR et une réaction de séquençage basée sur l'incorporation réversible des dNTPs marqués chacun par une base unique de fluorescence.



Le séquençage de 3<sup>ème</sup> génération est caractérisé par le séquençage d'une unique molécule d'ADN sans étape d'amplification. Ainsi, les conséquences de la PCR telles que les erreurs dans l'incorporation des nucléotides ou l'amplification préférentielle de certains fragments sont contournées. Comme pour la 2<sup>ème</sup> génération, de nombreuses sociétés participent à la " ruée " vers les nouvelles technologies de 3<sup>ème</sup> génération et proposent ainsi diverses approches de séquençage (Pareek *et al.*, 2011). Les technologies de 3<sup>ème</sup> génération présentent de nombreux avantages par rapport au séquençage de 2<sup>ème</sup> génération. Elles permettent de s'affranchir de l'étape d'amplification, réduire le temps et les coûts de séquençage mais aussi augmenter le débit d'analyse et la longueur des fragments séquencés facilitant les assemblages et diminuer les quantités de matrice initiale.

### 2.2.2. L'analyse des génomes des bactéries lactiques

Les banques de données publiques contiennent aujourd'hui plus de 200 séquences génomiques de bactéries lactiques, représentées par plus d'une cinquantaine d'espèces. De nombreux travaux de génomique descriptive, fonctionnelle et comparative ont accompagné les divers projets de séquençage (Campo *et al.*, 2002 ; Klaenhammer *et al.*, 2002 ; Makarova *et al.*, 2006 ; Makarova and Koonin, 2007 ; O'Sullivan *et al.*, 2009 ; Schroeter and Klaenhammer, 2009 ; Zhou *et al.*, 2010). En effet, l'étude et la comparaison des génomes des bactéries lactiques sont, aujourd'hui, des outils essentiels pour comprendre l'évolution des différents genres et espèces, expliquer leur adaptation à une niche écologique spécifique, appréhender les divergences fonctionnelles intra et inter-espèces et améliorer la sélection des levains industriels.

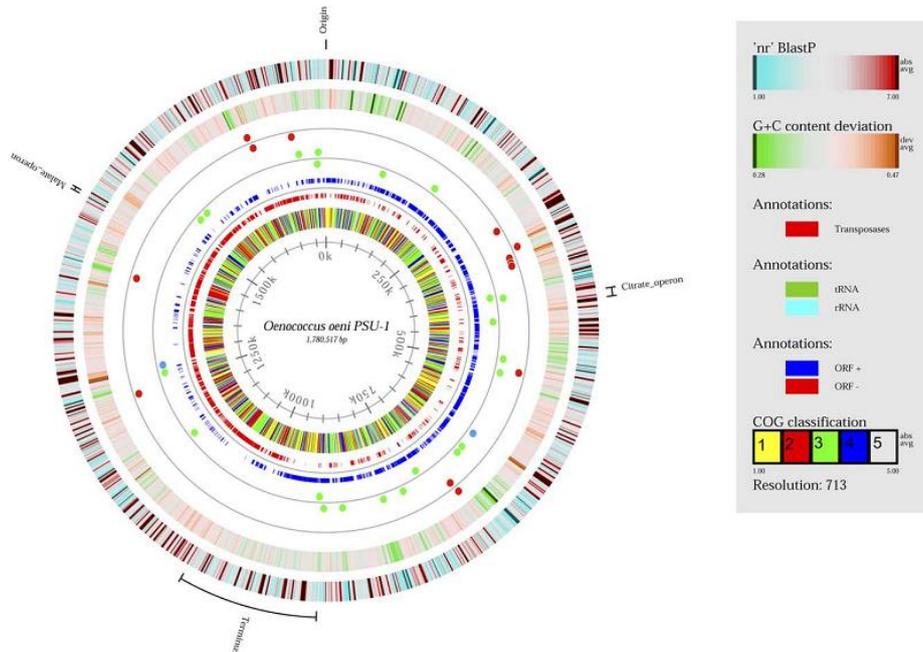
L'analyse des séquences génomiques a révélé une réduction relativement récente de la taille des génomes des bactéries lactiques. Le dernier ancêtre commun des *Lactobacillales* semble avoir perdu 600 à 1200 gènes et acquis moins d'une centaine de gènes lors de sa divergence avec l'ancêtre *Bacilli* (Makarova *et al.*, 2006 ; Makarova and Koonin, 2007). Malgré cette tendance générale, le nombre d'ORFs contenues dans les génomes des bactéries lactiques est très variable. Par exemple, l'espèce *O. oeni*, qui est caractérisée par son petit génome, présente seulement 1700-1800 ORFs, en comparaison des 3000 ORFs que contient *Lactobacillus plantarum*. En accord avec ces observations, la présence de pseudogènes, souvent en nombre plus élevé que chez d'autres groupes bactériens, est une



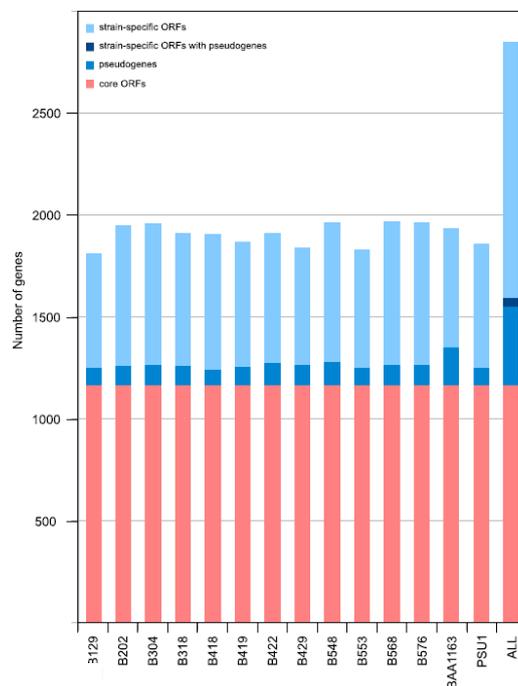
caractéristique indiquant un processus actif de l'évolution des génomes des bactéries lactiques. Ces modifications seraient liées principalement à l'adaptation de ces microorganismes à des niches écologiques riches en nutriments. De nombreux traits spécifiques, signes de cette adaptation, ont été détectés, comme l'abondance des gènes codant des transporteurs membranaires, la perte des voies de biosynthèse de nombreux composés, la présence de gènes impliqués dans la colonisation du tractus intestinal. Il a été également identifié des traits de résistance aux phages, qui sont présents en grand nombre lors des fermentations industrielles, et des plasmides qui confèrent parfois des propriétés d'intérêt technologique (Siezen *et al.*, 2008 ; Schroeter and Klaenhammer, 2009 ; Zhou *et al.*, 2010).

D'un point de vue plus appliqué, les analyses de génomique comparative permettent de comprendre la diversité intra-espèces, d'identifier les traits génétiques spécifiques d'une souche d'intérêt industriel et ainsi d'améliorer la sélection de nouveaux levains (Zhu *et al.*, 2009 ; Nyquist *et al.*, 2011). L'analyse du pan-génome (totalité des gènes de l'ensemble des souches d'une espèce) de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a révélé des caractéristiques génétiques spécifiques de la souche industrielle 2038, expliquant probablement sa supériorité technologique (Hao *et al.*, 2011). En effet, il a été identifié des gènes et voies métaboliques favorisant certainement la croissance dans le lait (biosynthèse et transport d'acides aminés, dégradation des protéines, synthèse de composés intermédiaires au métabolisme carboné) ou la résistance aux phages. Dans plusieurs domaines industriels, les bactéries lactiques sont utilisées et choisies pour leur contribution au caractère organoleptique du produit. Sur cette observation, Liu *et al.* (2008) ont réalisé une étude de génomique comparative plus ciblée concernant les voies métaboliques des acides aminés à l'origine de composés organoleptiques chez les bactéries lactiques, ce qui devrait fournir un excellent point de départ pour la sélection d'espèces ou de souches aux propriétés sensorielles.

L'étude des génomes est donc devenue une approche essentielle pour comprendre l'évolution et la diversité des bactéries lactiques, mais elle doit être complétée par des études de transcriptomique et/ou protéomique comparative (Linares *et al.*, 2010 ; Dressaire *et al.*, 2011 ; Tan-a-ram *et al.*, 2011).



**Figure 11. Carte du génome de la souche d'*O. oeni* PSU-1.** Les cercles concentriques, depuis l'intérieur vers l'extérieur, représentent pour chaque ORF : la classification COG, l'orientation des ORFs, les ARNt et ARNr, les transposases ou gènes incomplets, le biais GC et les résultats d'une analyse BLAST. (D'après Mills *et al.*, 2005)



**Figure 12. Composition du pan-génome de 14 souches d'*O. oeni*.** Bleu clair, ORFs spécifiques des souches ; bleu foncé, pseudogènes ; bleu-noir, ORFs tronquées spécifiques des souches ; rose, core-génome. (D'après Borneman *et al.*, 2012a)

### 2.2.3. Les premiers travaux de génomique chez l'espèce *O. oeni*

Le premier génome d'*O. oeni* a été séquencé par Mills *et al.* (2005) et correspond à la souche PSU-1, isolée d'un vin californien lors d'une FML spontanée (Figure 11) (Beelman *et al.*, 1977). Dans les années qui ont suivi, les souches d'*O. oeni* ATCC BAA 1163, AWRIB429 et une souche d'*O. kitaharae* ont également été séquencées, permettant ainsi d'établir les premières comparaisons génomiques (Bon *et al.*, 2009 ; Bartowsky and Borneman, 2011 ; Borneman *et al.*, 2010, Borneman *et al.*, 2012a ; 2012b). Les principales différences entre les deux espèces du genre *Oenococcus* repose sur des propriétés métaboliques (fermentation du malate et du citrate), la synthèse d'acides aminés (L-arginine et L-histidine) et des mécanismes de défense cellulaire. En effet, *O. kitaharae* présente de nombreux systèmes de résistance aux bactériophages (restriction/modification et séquences CRISPR) qui ne sont pas, ou peu, détectés chez *O. oeni*, qui évolue et se développe dans un milieu contraignant limitant la diversité et la compétition microbienne (Borneman *et al.*, 2012b).

Des travaux très récents incluant le séquençage de 11 nouvelles souches d'*O. oeni* permettent d'affiner la description des génomes et d'identifier des traits génétiques d'intérêt industriel (Borneman *et al.*, 2012a). Le génome d'*O. oeni* est caractérisé par sa petite taille, environ 1,8Mpb, un contenu en bases GC d'environ 38%, la présence de deux opérons ribosomiques, la prédiction de 1800 ORFs et 104 pseudogènes en moyenne ainsi qu'un core-génome composé de 1165 ORFs (Figure 12) (Borneman *et al.*, 2012a). Différents métabolismes liés à la croissance dans le vin ont été identifiés au niveau génétique, notamment l'opéron " malate " et l'opéron " citrate " (Mills *et al.*, 2005). De nombreuses divergences génétiques ont été mises en évidence chez les souches d'*O. oeni* (Athane *et al.*, 2008 ; Bihère *et al.*, 2009 ; Bon *et al.*, 2009 ; Borneman *et al.*, 2010, Borneman *et al.*, 2012a). Par exemple, 942 ORFs spécifiques de certaines souches et absentes chez la souche PSU-1 ont été détectées (Borneman *et al.*, 2012a). Les transferts horizontaux de gènes semblent jouer un rôle important dans la plasticité génétique des souches. Diverses régions génomiques de plusieurs kilobases résulteraient de ce type de transfert (Bon *et al.*, 2009 ; Borneman *et al.*, 2010 ; Borneman *et al.*, 2012a). Il a d'ailleurs été souligné une importante variabilité concernant le contenu en séquences d'origine phagique et la présence de plasmides a également été détectée. Sur la plan fonctionnel, il existe des variations dans la composition des opérons codant la production d'exopolysaccharides, la présence de gènes



impliqués dans l'utilisation et le transport des sucres et des acides aminés ou dans la production de composés aromatiques (Borneman *et al.*, 2010 ; Bartowsky and Borneman, 2011 ; Borneman *et al.*, 2012a). Mais pour l'instant, la diversité génomique d'*O. oeni* a été peu exploitée et les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer les différences phénotypiques observées en milieu œnologique, comme notamment la capacité de survie dans le vin et la capacité à réaliser rapidement et complètement la FML.



### 3. Les levains malolactiques

#### 3.1. Généralités

La FML, étape essentielle dans l'élaboration des vins rouges et certains vins blancs, est souvent qualifiée de " capricieuse et imprévisible ". Les FML spontanées réalisées par les bactéries lactiques indigènes sont souvent difficiles à contrôler. Leur déclenchement peut survenir plusieurs mois après la fermentation alcoolique et leur durée varier de quelques jours à plusieurs mois. La vinification devient alors très longue ce qui engendre certaines difficultés dans l'organisation du travail au chai, la durée d'élevage, la commercialisation et augmente les risques biologiques liés aux microorganismes indigènes d'altération. Par exemple, la levure *Brettanomyces bruxellensis* est particulièrement bien adaptée aux conditions du vin et peut se développer rapidement après la FA, lorsque les levures de type *S. cerevisiae* déclinent et laissent la niche écologique vacante (Renouf, 2006). Elle est la principale espèce incriminée dans la production de phénols volatils responsables de notes désagréables de " médicinal ", " animal ", " cuir " et du masquage des notes fruitées du vin (Suárez *et al.*, 2007). Les levains malolactiques sont, aujourd'hui, de plus en plus préconisés pour tenter de se substituer à la microflore indigène et, ainsi, assurer une sécurité fermentaire et limiter les risques biologiques (Renouf and Murat, 2008).

Un levain malolactique est une souche bactérienne isolée d'un vin en cours de fermentation malolactique spontanée, sélectionnée en laboratoire pour ses propriétés technologiques, produite et utilisée en quantité suffisante pour assurer le déclenchement et la dégradation rapide de l'acide L-malique présent dans le vin. Aujourd'hui, plus de quarante levains malolactiques sont commercialisés. La grande majorité contient une unique souche d'*O. oeni*, parfois un lactobacille ou un mélange de souches (Torriani *et al.*, 2010 ; du Toit *et al.*, 2011). Les levains malolactiques sont proposés principalement sous forme lyophilisée, parfois sous forme congelée et sont préconisés pour une inoculation directe dans le vin ou après une phase d'acclimatation au vin. Ils peuvent être utilisés en co-inoculation avec les levures au cours de la FA ou en inoculation séquentielle, après la FA. Le taux d'inoculation correspond généralement à  $10^6 - 10^7$  cellules/ml de vin.

**Tableau 1. Critères de sélection des levains malolactiques.**  
(D'après Torriani *et al.*, 2010)

Categories	Property
Stress resistance	Resistance to high levels of ethanol (14% v/v) Tolerance to pH 3.0 Resistance to high SO <sub>2</sub> concentrations Resistance to low temperatures Bacteriophages resistance, not lysogenic
Technological performances	High malolactic activity Ability to perform MLF in different types of wine Satisfactory growth in a synthetic medium Production of desirable flavours or enhancement of fruity aromas Low acetic acid production at the pH of grape juice and wine No production of ropo polysaccharides No production of off-flavours Compatibility with the yeast used for the alcoholic fermentation Can be freeze-dried
Safety	No production of biogenic amines No production of ethyl carbamate Inability to transmit antibiotic resistance genes

Malgré tous les progrès réalisés pour sélectionner les levains malolactiques, il est encore courant de rencontrer des problèmes d'implantation et de cinétiques fermentaires. Les recherches sur la production et la sélection des bactéries lactiques pour mener la FML sont encore récentes et de nombreuses pistes n'ont pas encore été abordées.

## **3.2. Sélection des levains malolactiques**

### **3.2.1. Principales étapes et critères de sélection**

Les démarches entreprises pour la sélection d'un levain malolactique sont très diverses, chaque équipe disposant d'outils d'analyse spécifiques et d'une expérience qui lui est propre. Cependant, des grandes lignes se dégagent des différents travaux de sélection (Torriani *et al.*, 2010). A la différence des levures commerciales sélectionnées pour leurs propriétés fermentaires et leurs caractéristiques spécifiques notamment dans la révélation d'arômes, la sélection des bactéries portent essentiellement sur les critères de survie et d'adaptation au milieu " vin " (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Dans un premier temps, un large panel de souches est isolé de vins en cours de FML spontanée. Le choix se porte en particulier sur des vins dont le pH, la teneur en alcool ou la présence de SO<sub>2</sub> sont particulièrement contraignants. Les clones bactériens obtenus sont repiqués plusieurs fois sur milieu gélosé afin d'obtenir des souches pures. Puis, une étape d'identification, souvent réalisée par PCR spécifique, est réalisée. Dans la plupart des cas, seules les souches d'*O. oeni* sont retenues. Un typage moléculaire est ensuite entrepris pour vérifier le profil génétique des souches nouvellement isolées et éliminer les clones redondants correspondants à une même souche. Il s'en suit de nombreux tests physiologiques menés en milieux de laboratoire et en conditions œnologiques (Tableau 1). Lors de cette étape, les capacités de survie et de croissance des souches en présence de différents stress (pH, alcool, SO<sub>2</sub>, etc), ainsi que leur activité malolactique, sont les points essentiels toujours évalués. L'absence de métabolismes préjudiciables à la qualité et à l'état sanitaire du vin est aussi recherchée. Puis, divers essais sont menés en condition de terrain afin de vérifier les propriétés œnologiques de la ou des souche(s) sélectionnée(s) au laboratoire et la qualité sensorielle du vin. Enfin, un procédé de production et un mode



d'inoculation adaptés sont développés pour conserver les caractéristiques technologiques du nouveau levain malolactique.

### **3.2.2. Les premiers travaux de sélection, approches phénotypiques**

Traditionnellement, les souches sélectionnées sont caractérisées en laboratoire par des approches phénotypiques longues et fastidieuses. Pour ces raisons, les premiers travaux de sélection ont été réalisés sur des nombres limités de souches (Kunkee *et al.*, 1964) ; une seule souche d'*O. oeni* a parfois été étudiée (Beelman *et al.*, 1977 ; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a). Les premiers essais de FML induites avec des souches de bactéries sélectionnées ont été menés par Peynaud et Domercq dans les années 1960. Le caractère imprévisible des FML indigènes les a conduit à essayer de provoquer la fermentation par ensemencement de cultures bactériennes pures, de la même façon que les levures sont inoculées pour mener la fermentation alcoolique (Pasteur, 1866 ; Jacquemin, 1897). A l'issue de leur travail mené avec succès, Peynaud et Domercq ont proposé un premier protocole de préparation et d'utilisation de bactéries sélectionnées pour induire la FML. Rapidement, la sélection des premières souches ML34 et PSU-1, commercialisées comme levains malolactiques, a été décrite (Kunkee *et al.*, 1964 ; Beelman *et al.*, 1977 ; Beelman *et al.*, 1980). Ces premières approches ciblaient les critères de sélection essentiels, mais restaient cependant très lourdes. L'identification des souches était particulièrement longue, parfois ambiguë et nécessitait des méthodes de microbiologie classique basées sur la mise en évidence de divers phénotypes (morphologie, profil de fermentation des sucres, croissance en présence de divers substrats, etc). Puis, de nombreux paramètres étaient étudiés pour caractériser les souches et définir un protocole d'utilisation adapté : influence du pH, de l'éthanol et du SO<sub>2</sub> sur la croissance et les cinétiques fermentaires, production d'acidité volatile, vérification de la qualité sensorielle des vins finis, détermination du stade d'inoculation optimal (Torriani *et al.*, 2010).

### **3.2.3. Sélection : premières approches de biologie moléculaire**

Dans les années 1990, l'ère de la biologie moléculaire a révolutionné la sélection des levains industriels. De nouveaux et nombreux outils ont été développés, notamment pour l'identification des espèces, le typage des souches et la détection de gènes conférant des



caractéristiques phénotypiques indésirables ou bénéfiques. Les études plus récentes ont alors appliqué ces techniques pour développer de nouvelles stratégies de sélection.

En premier lieu, ces technologies ont permis d'analyser et d'identifier un grand nombre de souches avec plus de facilité et de rapidité que les méthodes phénotypiques. Nielsen *et al.* (1996) ont été parmi les premiers à réaliser une sélection à grande échelle ; 850 isolats collectés de vins provenant de diverses origines géographiques ont été identifiés par hybridation ADN/ADN puis sélectionnés selon leurs capacités fermentaires. Aujourd'hui, les outils tels que la PCR spécifique de l'espèce *O. oeni* (Zapparoli *et al.*, 1998 ; Divol *et al.*, 2003), la PCR RAPD (Zavaleta *et al.*, 1997 ; Reguant and Bordons, 2003 ; Lechiancole *et al.*, 2006) et l'analyse REA-PFGE (Kelly *et al.*, 1993 ; Zapparoli *et al.*, 2000 ; Larisika *et al.*, 2008) sont largement utilisés pour identifier, typer et discriminer les souches d'*O. oeni*, facilitant ainsi les premières étapes de la sélection (Carreté *et al.*, 2006 ; Guzzon *et al.*, 2009 ; Capozzi *et al.*, 2010 ; Ruiz *et al.*, 2010 ; Solieri *et al.*, 2010 ; Torriani *et al.*, 2010 ; Lerm *et al.*, 2011). Certains auteurs ont aussi utilisé ces outils de typage moléculaire, notamment la PCR RAPD, au cours de la caractérisation phénotypique des souches. Afin de tester un plus grand nombre de souches, ils ont réalisé des FML à partir de culture multi-souches, ont détecté les clones dominants par PCR RAPD et les ont ainsi sélectionné pour des tests supplémentaires (Carreté *et al.*, 2006 ; Guzzon *et al.*, 2009).

Dans un second temps, la caractérisation génétique de diverses voies métaboliques et le développement de PCR spécifiques de gènes ont permis de détecter plus facilement et rapidement des traits phénotypiques bénéfiques ou indésirables à la qualité du vin. Dès les premières étapes de sélection, les métabolismes non désirés liés à la production d'amines biogènes, de carbamate d'éthyle ou de polysaccharides filants peuvent être recherchés par PCR ciblant les gènes de ces voies métaboliques (Divol *et al.*, 2003 ; Walling *et al.*, 2005 ; Araque *et al.*, 2009 ; Coton *et al.*, 2010). Ainsi, les souches présentant ces caractéristiques génétiques indésirables peuvent être rapidement exclues de l'analyse. La recherche de phénotypes désirés par PCR est également intéressante lors des premières étapes de sélection et fournit des informations complémentaires pour les approches phénotypiques. Des enzymes contribuant à la complexité aromatique du vin, telles que la  $\beta$ -glucosidase à l'origine de l'hydrolyse des précurseurs glycosylés des arômes fruités, ou certaines estérases



responsables à la fois de la biosynthèse et de l'hydrolyse des esters, peuvent être facilement détectées par des PCR spécifiques (Lerm *et al.*, 2011).

Grâce à ces progrès technologiques, l'identification et la détection des souches d'intérêt ont nettement été simplifiées, permettant une caractérisation phénotypique plus précise et plus complète de leurs propriétés technologiques. Dans certains travaux, l'étude phénotypique consiste à étudier un panel de souches isolées de différents vins en conditions de laboratoire selon leurs capacités de croissance et leur activité malolactique en présence de divers facteurs de stress (éthanol, pH, température, SO<sub>2</sub>) (Solieri *et al.*, 2010 ; Guzzon *et al.*, 2009). Puis, la meilleure souche retenue est produite sous forme lyophilisée ou congelée selon les protocoles industriels afin de confirmer ses performances œnologiques lors d'une étude en conditions réelles de vinification. A l'inverse, d'autres auteurs ont d'abord sélectionné les meilleures souches de leur collection d'après un suivi de fermentation, puis ils ont réalisé une batterie de tests pour les différencier et proposer la souche la plus performante (Ruiz *et al.*, 2010 ; Lerm *et al.*, 2011). Ils se sont également intéressés à rechercher différentes enzymes (décarboxylase, glycosidase, estérase, protéase, etc) ayant un impact potentiel sur le profil aromatique ou la qualité du vin, à comparer les souches d'après l'analyse sensorielle des vins finis et à évaluer leurs capacités de résistance au procédé de lyophilisation.

#### **3.2.4. Sélection : combinaisons d'approches phénotypiques et moléculaires**

Les connaissances sur les bases génétiques à l'origine des phénotypes d'intérêt technologique d'*O. oeni* sont encore très incomplètes. Pour cette raison, les principales propriétés recherchées chez les levains malolactiques, telles que la capacité à survivre dans le vin et à réaliser la FML rapidement, sont encore évaluées essentiellement par des tests phénotypiques. Néanmoins, de nombreux efforts ont été menés afin de développer des stratégies de sélection de souches d'intérêt œnologique basées sur des données moléculaires. Les approches proposées combinent des tests phénotypiques et des analyses moléculaires qui sont de trois types : (i) analyse de groupes génétiques identifiés par typage moléculaire (ii) analyse de l'expression de gènes de stress, (iii) détection de gènes spécifiques.



### Analyse des groupes génétiques

Plusieurs auteurs ont tenté de rechercher des corrélations entre les propriétés phénotypiques et des groupes génétiques de souches d'*O. oeni*. Une corrélation seulement partielle a été mise en évidence entre l'activité malolactique de souches isolées de vins italiens et des groupes génétiques différenciés par AFLP (Capello *et al.*, 2008 ; Capello *et al.*, 2010). L'analyse de 43 souches d'origines diverses par MLST a permis d'identifier deux groupes génétiques de souches, A et B, dont l'un, le groupe A, contient la quasi-totalité des levains malolactiques (Bilhère *et al.*, 2009). Ce résultat a été confirmé par l'analyse de 200 souches supplémentaires par la même méthode (Bridier *et al.*, 2011). D'autres auteurs se sont intéressés à la composition en acides gras des cellules d'*O. oeni*, dont l'abondance varie significativement selon les souches ce qui pourrait expliquer leurs différences de viabilité cellulaire et d'activité malolactique (Guerrini *et al.*, 2003). Deux groupes distincts ont été révélés mais n'ont pas été corrélés à des profils génétiques obtenus par Apal-PFGE. La recherche des corrélations entre phénotypes et génotypes paraît donc encourageante, mais à l'heure actuelle il est encore impossible de sélectionner des souches sur la seule base de leur groupe génétique, quelle que soit la méthode de typage utilisée.

### Analyse du niveau d'expression de gènes de stress.

Les gènes impliqués dans la réponse au stress sont souvent utilisés comme marqueur moléculaire de l'adaptation des levains bactériens au milieu vin. Certains ont été identifiés chez *O. oeni*. Ils interviennent dans la réponse au stress général, la composition et la fluidité membranaire, l'homéostasie, la résistance à divers composés toxiques, la réponse au stress oxydatif ou la dégradation des acides nucléiques (Jobin *et al.*, 1999 ; Bourdineaud *et al.*, 2003 ; Beltramo *et al.*, 2004 ; Bourdineaud *et al.*, 2004 ; Coucheney *et al.*, 2005b ; Grandvalet *et al.*, 2005 ; Beltramo *et al.*, 2006 ; Athane *et al.*, 2008 ; Grandvalet *et al.*, 2008 ; Weidmann *et al.*, 2010). Parmi eux, le gène *hsp18* codant une " small heat shock protein " est considéré comme un bon marqueur de stress (Guzzo *et al.*, 1997). Une approche de sélection propose notamment de mesurer l'expression du gène codant la protéine Lo18 comme marqueur de l'état physiologique des souches d'*O. oeni* et de leurs capacités à survivre et à mener la FML (Coucheney *et al.*, 2005a). D'autres auteurs ont utilisé une combinaison de tests phénotypiques et moléculaires pour sélectionner de nouveaux starters, incluant également



la mesure de l'expression du gène *hsp18* (Capozzi *et al.*, 2010). Celui-ci apparaît comme un bon indicateur des performances technologiques des souches d'*O. oeni*, mais l'étude de ce gène renseigne seulement sur leur état physiologique et ne traduit pas forcément de meilleures capacités fermentaires (Zapparoli *et al.*, 2004). Tout comme *hsp18*, il a été démontré par Olguín *et al.* (2010) que l'expression des gènes *clpP*, *ctsR*, *rmlB*, *cfa* et *trxA* liés à la réponse au stress était significativement plus élevée chez les souches malolactiques performantes. L'expression simultanée des trois gènes *clpP*, *hsp18* et *ctsR* serait corrélée à une plus grande capacité d'adaptation des souches d'*O. oeni* (Beltramo *et al.*, 2006 ; Olguín *et al.*, 2010).

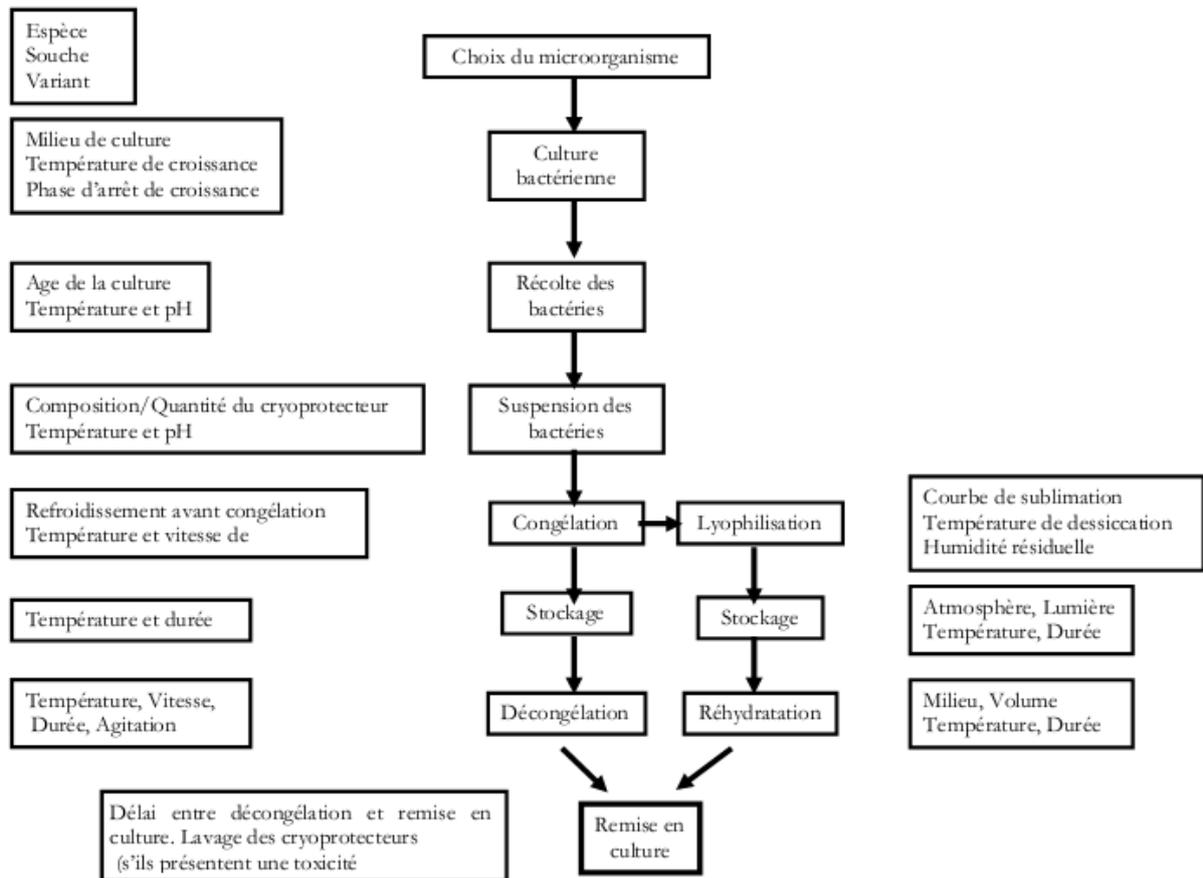
#### Présence de gènes spécifiques.

La troisième approche consiste à rechercher des gènes spécifiques des souches d'intérêt œnologique par génomique comparative. L'hybridation soustractive des génomes de souches, à fort ou faible " potentiel œnologique " a mis en évidence 51 séquences spécifiques, dont certaines ont permis de grouper distinctement les souches à fort et faible " potentiel œnologique " (Delaherche *et al.*, 2006 ; Bon *et al.*, 2009). Une corrélation entre le nombre de marqueurs génétiques, choisis parmi ces 51 séquences, que contient une souche et sa capacité d'adaptation au vin a également été observée (Renouf *et al.*, 2008 ; Renouf *et al.*, 2009). Pourtant des résultats ne permettant pas de confirmer l'importance phénotypique de ces gènes ont également été rapportés (Athane *et al.*, 2008 ; Renouf and Favier, 2010). A ce jour, ces approches ne permettent pas d'orienter significativement la sélection des levains malolactiques.

### **3.3. Production des levains malolactiques**

#### **3.3.1. L'importance des conditions de production**

La commercialisation de souches microbiennes, qu'il s'agisse de bactéries, levures ou moisissures, nécessite de les conditionner sous une forme stable. Dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire, les techniques de séchage (atomisation, fluidisation et lyophilisation) sont les plus répandues pour stabiliser et conserver les microorganismes. L'élimination d'eau bloque le métabolisme cellulaire et fige les cellules dans leur état



**Figure 13. Facteurs influençant la survie des bactéries lactiques au cours des différentes étapes des procédés de congélation et lyophilisation. (D'après Coulilaby *et al.*, 2011)**

physiologique. De plus, le séchage est une solution pratique qui facilite la manipulation et le stockage et en réduit les coûts.

La production de microorganismes à l'échelle industrielle est une étape complexe et délicate, source de nombreux stress liés notamment aux variations de température et au phénomène de déshydratation. Une mauvaise maîtrise de ces techniques peut être à l'origine de dommages cellulaires (dommages aux parois et membranes cellulaires, oxydation des membranes lipidiques, dénaturation des ADN et protéines) et altérer ainsi la viabilité et les propriétés des souches d'intérêt technologique (Nielsen *et al.*, 1996 ; Maicas *et al.*, 1999 ; Maicas *et al.*, 2000 ; Zhao and Zhang, 2005 ; Zhao and Zhang, 2009a ; 2009b). De récentes études sur la bactérie probiotique *Lactobacillus rhamnosus* montrent en effet, que les isolats d'une même souche produite sous différentes formes ont des propriétés probiotiques significativement variables (capacités d'adhésion au mucus intestinal, tolérance au pH et aux acides biliaires, etc) (Grześkowiaka *et al.*, 2011 ; Nivoliez *et al.*, 2012). Il apparaît donc primordial de bien maîtriser ces techniques pour préserver les propriétés technologiques originelles des souches industrielles. Cependant, l'optimisation des procédés de production industrielle est complexe puisque son succès dépend de multiples facteurs qu'il est parfois difficile d'étudier séparément (Figure 13) (Coulilaby *et al.*, 2011).

### 3.3.2. Principe de la lyophilisation

La lyophilisation, ou " séchage à froid ", a été développée au cours de la seconde guerre mondiale pour le stockage du plasma sanguin (Pegg, 2002). Aujourd'hui, de nombreux produits alimentaires, vaccins, médicaments et microorganismes sont produits sous cette forme qui assure une conservation à long terme des propriétés du produit (valeurs nutritives et sensorielles, principes actifs, propriétés probiotiques ou œnologiques, etc). La lyophilisation consiste à éliminer l'eau d'un produit liquide ou solide par l'action combinée du froid et du vide, à l'aide d'un lyophilisateur. Elle comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire. Lors de la congélation, l'eau contenue dans le produit est cristallisée ; une partie à l'état pur et l'autre en mélange avec les solutés du milieu formant une matrice interstitielle entre les cristaux de glace. La vitesse de congélation est un paramètre important qui conditionne la taille des cristaux. Une congélation rapide crée une matrice peu poreuse pour une dessiccation lente et forme de



petits cristaux de glace intracellulaires non dommageables pour les cellules. La sublimation (séchage primaire) et la dessiccation secondaire se déroulent dans une enceinte où règne une pression largement inférieure à la pression atmosphérique (de l'ordre de 0,1 à 1 mBar). Dans cet environnement, l'eau pure cristallisée se sublime ; elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux sous l'effet d'un réchauffement à très basse pression. La sublimation forme une matrice légèrement poreuse permettant la dessiccation secondaire c'est-à-dire la désorption et l'évaporation des molécules d'eau liées, formant avec les solutés, la matrice interstitielle. La vapeur d'eau produite lors de ces étapes est piégée par congélation grâce à un condensateur présent dans l'enceinte de lyophilisation (Coulilaby *et al.*, 2011).

Cette technique est souvent associée à l'utilisation de cryoprotecteurs, substances assurant la protection des cellules durant une congélation, une décongélation et/ou un stockage à basse température (Carvalho *et al.*, 2004 ; Zhao and Zhang 2005 ; Zhao and Zhang 2009a ; 2009b). Les modes d'action dépendent de la nature du cryoprotecteur. De façon générale, ils participent à la diminution de la taille des cristaux de glace et de leur vitesse de croissance, à la stabilisation des protéines, à la réduction du choc osmotique.

### **3.3.3. Préparation industrielle des levains malolactiques**

Depuis la reconnaissance de la FML comme une étape essentielle à l'élaboration du vin, différentes techniques ont été proposées pour la contrôler, de la macération carbonique déclenchant une dégradation intracellulaire de l'acide malique dans les baies de raisin à l'utilisation de cellules ou enzymes immobilisées, en passant par l'inoculation de levures capables de dégrader l'acide malique (Davis *et al.*, 1985 ; Lonvaud-Funel, 1995 ; Maicas, 2001). Ces méthodes ont néanmoins été abandonnées ou peu développées pour causes de dégradation partielle de l'acide malique, de modifications sensorielles indésirables ou de difficultés de mise en œuvre. L'inoculation de bactéries lactiques produites sous forme lyophilisée, parfois sous forme congelée, est aujourd'hui quasiment l'unique moyen pour contrôler la FML.

Lors des travaux de sélection de levains malolactiques réalisés jusqu'à aujourd'hui, les étapes de production des souches n'ont jamais été considérées comme une priorité, à l'exception de certains travaux (Nielsen *et al.*, 1996 ; Coucheney *et al.*, 2005a). Quand il est



étudié, ce paramètre est seulement testé sur les quelques souches déjà sélectionnées par des tests phénotypiques et moléculaires (Guzzon *et al.*, 2009 ; Ruiz *et al.*, 2010 ; Solieri *et al.*, 2010). Pourtant, l'impact des conditions de préparation et du mode d'inoculation sur les capacités des souches à se développer et à conduire cette fermentation a été révélé dès les premiers essais d'induction des FML par inoculation de bactéries et dès le développement des premières souches commerciales (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a ; Nielsen *et al.*, 1996).

Tout d'abord, la production d'importantes biomasses bactériennes nécessite un milieu de culture adapté, particulièrement pour l'espèce *O. oeni* qui est difficile à cultiver en conditions de laboratoire. Généralement, les levains malolactiques sont produits en milieux riches apportant les éléments nutritionnels essentiels ; ils contiennent principalement du jus de raisin, de pomme ou de tomate (source de sucres et facteurs de croissance), des extraits de levures et des sels minéraux (Kunkee *et al.*, 1964 ; Maicas *et al.*, 2000 ; Ruiz *et al.*, 2010). Le tween80® composé essentiellement d'acide oléique est souvent additionné au milieu de culture des bactéries lactiques pour améliorer leur viabilité, leur croissance cellulaire et diminuer les temps d'incubation (Guerrini *et al.*, 2002a). Il a été montré que la composition du milieu de production conditionnait la survie des souches au cours du procédé et leur capacité à dégrader l'acide malique dans le vin. Certains milieux permettent une production de biomasse importante mais induisent une perte des résistances et des propriétés technologiques de certaines souches (Maicas *et al.*, 2000). Ces mêmes auteurs conseillent l'association de glucose et fructose dans le milieu ainsi qu'un contrôle du pH au cours de la croissance pour assurer une quantité de biomasse suffisante (Maicas *et al.*, 1999). L'influence de nombreux autres paramètres sur la survie d'*O. oeni* après congélation – lyophilisation a été démontrée comme la concentration cellulaire, la nature du cryoprotecteur, la vitesse de congélation, etc (Zhao and Zhang, 2009a ; 2009b). Cependant, malgré une résistance élevée de l'espèce *O. oeni* face à la lyophilisation, l'effet " souche " est le premier critère à prendre en compte (Nielsen *et al.*, 1996 ; Maicas *et al.*, 2000 ; Alegria *et al.*, 2004). Ainsi, la caractérisation des souches lyophilisées devrait être prise en compte dès les premières phases de la sélection des levains malolactiques.



### 3.4. Conservation et réhydratation des levains malolactiques

#### 3.4.1. Importance des conditions de conservation

La conservation des microorganismes produits sous forme séchée est délicate car il apparaît au cours du temps, un phénomène d'oxydation des membranes lipidiques (Teixeira *et al.*, 1996 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Coulilaby *et al.*, 2011). Le choix du cryoprotecteur, le contrôle des températures de stockage, de l'atmosphère, du taux d'humidité et de l'exposition à la lumière permettent de réduire les risques d'oxydation et d'améliorer la viabilité cellulaire.

Les levains malolactiques lyophilisés sont principalement conservés en sachet opaque, parfois sous vide, à 4°C ou -20°C. Au-delà des facteurs précédemment cités, la survie et les capacités fermentaires des souches d'*O. oeni* dépendent du milieu de production choisi (Maicas *et al.*, 2000). Ces travaux révèlent qu'il n'existe pas de corrélation entre la survie des souches après production et les propriétés technologiques et suggèrent donc que le paramètre de viabilité n'est pas l'unique critère à évaluer pour optimiser les conditions de production des souches lyophilisées. Chez *O. oeni*, il a aussi été montré que le cryoprotecteur optimal pour les conditions de lyophilisation n'assurait pas forcément une viabilité maximale lors du stockage ; c'est le cas du tréhalose et de l'inuline (Zhao and Zhang, 2009b). Par contre, le glutamate de sodium semble conférer une protection à la fois lors de la lyophilisation et durant le stockage avec un maintien de la viabilité supérieure à 70% (Zhao and Zhang, 2009b). Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui ont démontré l'importance de ce composé dans la lyophilisation et la cryoconservation de divers microorganismes dont beaucoup de bactéries lactiques (Carvalho *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004).

#### 3.4.2. Réhydratation et acclimatation

La réhydratation des souches d'*O. oeni* comme de nombreux autres microorganismes est une étape essentielle affectant également la viabilité cellulaire. Il a été démontré par de nombreux travaux que l'inoculation directe dans le vin des souches d'*O. oeni* lyophilisée, ou produite sous forme congelée, est fortement préjudiciable à leur capacité à survivre, à se



développer et à mener la FML (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983a ; Davis *et al.*, 1985). L'utilisation du milieu de production permet une réhydratation optimale, de même qu'une solution de glutamate de sodium ou un tampon phosphate (Zhao and Zhang, 2005 ; Zhao and Zhang, 2009b). Pourtant, une simple réhydratation des souches d'*O. oeni* n'est parfois pas suffisante et une étape d'acclimatation au milieu " vin " peut être nécessaire pour assurer une FML rapide et complète (Cecconi *et al.*, 2009). Cette phase consiste à incuber les souches réhydratées ou lyophilisées pendant quelques heures dans un milieu d'acclimatation qui peut contenir du jus de raisin ou du vin, des extraits de levures ou des levures inertées apportant les éléments nutritionnels directement assimilables par les bactéries, des écorces de levures pour détoxifier le jus de raisin ou le vin en adsorbant les inhibiteurs de type acides gras et du Tween80® pour stimuler la survie et l'activité malolactique d'*O. oeni* (Davis *et al.*, 1985 ; Guerrini *et al.*, 2002a). La période d'acclimatation permet de réduire l'effet de l'inoculation, notamment dans des vins très contraignants et assure des taux de survie et des cinétiques fermentaires meilleures qu'après une simple réhydratation (Cecconi *et al.*, 2009). L'acclimatation des souches au milieu " vin " induit la surexpression de certaines protéines impliquées dans la transcription – traduction, dans le métabolisme des acides aminés, dans le transport et le catabolisme des sucres et de certaines enzymes comme la glutathione réductase, la cysthionine lyase et la fructose-6-phosphate transaminase. L'expression de ces protéines signe l'adaptation des souches à un environnement acide, riche en alcool et à un stress oxydatif. Elle traduit également la reprise du métabolisme nécessaire à la croissance et à la synthèse des parois cellulaires. Selon Cecconi *et al.* (2009), une étape d'acclimatation de 24h à 25°C dans un milieu synthétique mimant le vin est fondamental pour réactiver le métabolisme cellulaire et maintenir les propriétés technologiques des souches d'*O. oeni*.



# **MATERIELS ET METHODES**

**Tableau 2. Liste des 44 souches d'*Oenococcus oeni*.**

Nom	Désignation	Origine	Année d'isolement
<b><i>Oenococcus oeni</i></b>			
IOEB 0026	IOEB 0026	Vin rouge, FA, Gironde, France	2000
IOEB 0501	IOEB 0501	Vin rouge biologique, Centre, France	2005
IOEB 0608	IOEB 0608	Vin rouge, Gironde, France	2006
IOEB 8419	IOEB 8419	Vin rouge filant, France	1984
IOEB 9115	IOEB 9115	Vin rouge, Barrique, Gironde, France	1991
IOEB 9304	IOEB 9304	Cidre, France	1993
IOEB 89006	IOEB 89006	Vin rouge	1989
IOEB 89127	IOEB 89127	Vin rouge	1998
IOEB-SARCO 268	IOEB S268	Vin rouge, FML, Gironde, France	2000
IOEB-SARCO 384	IOEB S384	Vin blanc, FML, Savoie, France	2000
IOEB-SARCO 422	IOEB S422	Vin blanc, FML, Jura, France	2002
IOEB-SARCO 433a	IOEB S433a	Vin rouge, FML, Midi-Pyrénées, France	2002
IOEB-SARCO 455	IOEB S455	Vin blanc, Rhône-Alpes, France	ND
SARCO 4	S4	Vin rouge, FA, Gironde, France	2009
SARCO 11	S11	Vin blanc effervescent, FML, Centre, France	2008
SARCO 12	S12	Vin blanc, FA, Gironde, France	2009
SARCO 13	S13	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 14	S14	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 15	S15	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 17	S17	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 18	S18	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 19	S19	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 20	S20	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
SARCO 22	S22	Vin blanc, FML, Bourgogne, France	2009
SARCO 23	S23	Vin blanc, FML, Angleterre	2009
SARCO 24	S24	Vin rouge, FML, Angleterre	2009
SARCO 25	S25	Vin rouge, Gironde, France	2009
SARCO 26	S26	Vin rouge, Gironde, France	2009
SARCO 27	S27	Vin rouge, Gironde, France	2009
SARCO 28	S28	Vin rouge, Gironde, France	2009
SARCO 29	S29	Vin rouge, FML, Gironde, France	2009
ATCC BAA 1163	ATCC BAA 1163	Vin rouge, FML, Gironde, France	1984
Lactoenos 350Preac	350Preac	Souche commerciale, LAFFORT Œnologie	2007
Lactoenos 450Preac	450Preac	Souche commerciale, LAFFORT Œnologie	2003
Lactoenos B16	B16	Souche commerciale, LAFFORT Œnologie	ND
Lactoenos SB3	SB3	Souche commerciale, LAFFORT Œnologie	2000
Lalvin 31	L31	Souche commerciale, Lallemand	ND
Lalvin VP41	VP41	Souche commerciale, Lallemand	ND
Oeno2	Oeno2	Souche commerciale, Lamothe Abiet	ND
Vitilactic Starter BL01	BL01	Souche commerciale, Station Œnoteknique de Champagne	ND
Viniflora CiNe	CiNe	Souche commerciale, Hansen	ND
Vitilactic F	VF	Souche commerciale, Martin Vialatte	ND
PSU-1	PSU-1	Souche commerciale, Californie, USA	1972
VF-	VF-	Souche VF ΔpOEN-1	2008

## 1. Bactéries, conditions de culture, lyophilisation et conservation

### 1.1. Souches du genre *Oenococcus*

La collection de l'étude comprend 44 souches d'*O. oeni* qui ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génétique, elles sont référencées dans le Tableau 2. La collection compte 11 souches commerciales obtenues auprès de sept groupes industriels, 14 souches de la collection de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (IOEB), 1 souche de la collection American Type Culture Collection (ATCC) and 18 souches isolées d'échantillons de vins rouges et blancs lors des campagnes de vinification 2008 et 2009. Ces dernières ont été déposées dans la collection SARCO. Plusieurs autres souches ont également été utilisées pour l'étude de leur séquence génomique et sont indiquées dans le Tableau 3. Au cours de cette étude, le génome de 19 souches d'*O. oeni* a été séquencé et aujourd'hui, 14 autres génomes sont publiés dans les bases de données. *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 a été obtenue auprès de la collection Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

### 1.2. Culture des souches d'*O. oeni*

Les souches d'*O. oeni* sont cultivées en milieu " jus de raisin " composé de jus de raisin rouge commercial 250 ml/l, extraits de levure 5 g/l, Tween80® 1 ml/l et incubées à 25°C sous anaérobiose pendant 7 à 10 jours. Le milieu solide est obtenu par addition d'agar à 20 g/l et coulé dans des boîtes de Pétri. Si nécessaire et après stérilisation, les milieux sont supplémentés en pimarinine (100 mg/l) et biphényl (150 mg/l) pour inhiber la croissance des levures et moisissures, respectivement.

Un milieu à base de jus de pomme est utilisé pour la production de biomasse bactérienne lyophilisée. Le milieu " jus de pomme " contient pour 1 litre : jus de pomme commercial (250 ml), extrait de levure (25 g), glucose (20 g), fructose (12,5 g), tri-sodium citrate 2-hydrate (2,5 g), sulfate de magnésium ( $\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ) (200 mg), sulfate de manganèse ( $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ) (80 mg), Tween80® (60 µl). Les cultures sont incubées 3 jours sous anaérobiose à 25°C.

Les milieux de culture liquide et solide sont stérilisés 15 min à 121°C à l'autoclave.

**Tableau 3. Liste des souches d'*O. oeni* dont le génome est séquencé.**

Nom	Désignation	Origine, fournisseur	Numéro d'accession (Genbank)	Références
IOEB 0205	IOEB 0205	France		Cette étude
<b>IOEB 0501</b>	IOEB 0501	France		Cette étude
IOEB 0502	IOEB 0502	France		Cette étude
IOEB 0607	IOEB 0607	France		Cette étude
<b>IOEB 0608</b>	IOEB 0608	France		Cette étude
IOEB 8417	IOEB 8417	France		Cette étude
<b>IOEB 9304</b>	IOEB 9304	France		Cette étude
IOEB 9517	IOEB 9517	France		Cette étude
IOEB 9613	IOEB 9613	France		Cette étude
IOEB 9701	IOEB 9701	France		Cette étude
IOEB 9803	IOEB 9803	France		Cette étude
IOEB 9805	IOEB 9805	France		Cette étude
<b>SARCO 11</b>	S11	France		Cette étude
<b>SARCO 13</b>	S13	France		Cette étude
<b>SARCO 22</b>	S22	France		Cette étude
<b>SARCO 25</b>	S25	France		Cette étude
<b>SARCO 28</b>	S28	France		Cette étude
<b>ATCC BAA 1163</b>	ATCC BAA 1163	France	AAUV00000000	
AWRIB304	AWRIB304	Australie	AJII00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB318	AWRIB318	Australie	ALAD00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB418 (MCW)	MCW	Etats-Unis, Lallemand	ALAE00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB419 (Lalvin EQ54)	EQ54	France, Lallemand	ALAF00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB422 (Viniflora CH35)	CH35	CHR Hansen	ALAG00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
<b>AWRIB429 (Lalvin VP41)</b>	VP41	Italie, Lallemand	ACSE00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
<b>AWRIB548 (Vitulactic BL01)</b>	BL01	France, Station Cœnotechnique de Champagne	ALAH00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB553	Elios-1	France, Lallemand	ALAI00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB568	AWRIB568	Australie	ALAJ00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
AWRIB576	AWRIB576	Australie	ALAK00000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012a
<b>Lactoenos B16</b>	B16	France, LAFFORT		Cette étude
<b>Lactoenos SB3</b>	SB3	France, LAFFORT		Cette étude
<b>PSU-1</b>	PSU-1	Etats-unis	NC_008528	Mills <i>et al.</i> , 2005

Gras, souche appartenant à la collection de 44 souches d'*O. oeni* présentée dans le Tableau 2.

### 1.3. Procédé de lyophilisation des bactéries

La lyophilisation ou séchage à froid consiste à retirer le contenu en eau d'un produit par sublimation afin d'en assurer sa stabilité et faciliter sa conservation. Le principe général repose sur la sublimation qui correspond au passage d'un élément (dans ce cas, l'eau) de l'état solide à l'état gazeux sans passer sous la forme liquide. Ainsi, le procédé de lyophilisation consiste à (i) congeler le produit, (ii) sublimer la glace en vapeur d'eau sous l'effet du vide, (iii) capter l'eau à l'état gazeux et (iv) sécher le produit à froid.

A partir d'une culture solide, une colonie isolée est repiquée dans 5 ml de milieu " jus de raisin " liquide lequel est incubé 3 jours à 25°C. La totalité de la culture est ensuite,ensemencée dans 50 ml de milieu « jus de pomme » et incubée selon les mêmes conditions. De la même façon, un dernier " fed-batch " est réalisé dans 500 ml de milieu de production. La biomasse bactérienne produite est récoltée par simple centrifugation (4500 rpm, 10°C, 15 min), lavée et concentrée 50 fois dans de l'eau physiologique (9‰ NaCl). Un cryoprotecteur composé de Gecoll® (gélatine d'origine porcine, LAFFORT) 200 g/l, MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 100 mg/l et Tween80® 500 µl/l est additionné aux sédiments à 40% (p/p). Enfin, la suspension cellulaire homogénéisée est congelée à -80°C pendant une nuit puis lyophilisée sur une période de 24h à l'aide d'un lyophilisateur (Christ). Enfin, les lyophilisats sont broyés stérilement et conservés à -20°C.

Le rendement de production spécifique à chaque souche prend en compte la masse de lyophilisat récolté, sa concentration cellulaire déterminée par épifluorescence et la concentration théorique d'utilisation des levains industriels (10<sup>11</sup> cellules viables/g). Le rendement de production calculé se définit donc comme étant la quantité de levain à concentration d'utilisation produite pour 1 litre de production.

### 1.4. Conservation des bactéries

Les bactéries peuvent être conservées sous différentes formes pour de longues périodes. Traditionnellement en laboratoire, les cultures bactériennes récoltées en phase exponentielle de croissance sont supplémentées en glycérol (30% v/v) et conservées à -80°C. Au cours de l'étude, les souches produites sous forme lyophilisée sont conservées à -20°C.



## 2. Analyses microbiologiques, chimiques et biochimiques

### 2.1. Mesure de la croissance bactérienne

#### 2.1.1. Mesure de la turbidité d'une suspension cellulaire

La turbidité d'un milieu de culture, proportionnelle à la concentration cellulaire, permet d'estimer rapidement la population bactérienne. Elle est évaluée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio-Rad). Pour l'espèce *O. oeni* cultivée en milieu " jus de raisin " ou " jus de pomme ", 1 unité de  $DO_{600nm}$  est équivalente à  $2 \times 10^9$  cellules/ml.

#### 2.1.2. Dénombrement des colonies sur milieu solide

Le dénombrement sur milieu solide permet d'évaluer les bactéries viables, cultivables d'une suspension par comptage des unités formant colonie (UFC). Des dilutions décimales de la culture (100  $\mu$ l) sont déposées et étalées à l'aide de bille sur milieu " jus de raisin " solide. Après incubation, seules les boîtes de Pétri contenant 30 à 300 colonies sont dénombrées.

#### 2.1.3. Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence

Le dénombrement par épifluorescence permet l'estimation immédiate des cellules viables dans un échantillon. Le principe de la technique utilisée repose sur la dégradation d'un substrat, l'acétate de fluorescéine, en un fluorochrome, la fluorescéine, par une estérase intracellulaire. Les cellules viables caractérisées par une activité estérasique et une intégrité membranaire émettent alors une lumière de fluorescence verte et peuvent ainsi être facilement dénombrées à l'aide d'un microscope.

La limite de détection de la méthode étant de  $10^3$  cellules/ml, une fraction ou une dilution d'un échantillon est filtrée sur une membrane de porosité de 0,4  $\mu$ m (Chemunex). Cette membrane est alors déposée sur un support inhibé d'une solution de marquage (500  $\mu$ l de tampon ChemSol B16 + 2,5  $\mu$ l de substrat ChemChrome V6, Chemunex) et incubée 20 min à 30°C en obscurité totale. Préparée entre lame et lamelle, la membrane est



observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) équipé du filtre approprié (Olympus 467803) au grossissement  $\times 1000$ . Les cellules sont comptées dans 10 ou 20 champs puis la valeur moyenne est multipliée par le nombre de champs composant la membrane, donnant ainsi le nombre de cellules viables contenues dans l'échantillon filtré.

## **2.2. Dosage enzymatique des acides organiques**

Dans cette étude, l'acide L-malique, l'acide citrique et l'acide acétique sont dosés lors des essais de vinification grâce au kit enzymatique Roche Boehringer (R-biopharm). Le principe général de ces dosages repose sur la mesure de l'augmentation ou diminution de l'absorbance à 340 nm du NADH, composé dont la quantité finale est proportionnelle à celle de la molécule dosée, initialement présente dans le milieu réactionnel.

### **2.2.1. Dosage de l'acide L-malique**

Le principe du dosage repose sur l'oxydation de l'acide L-malique en oxaloacétate en présence du coenzyme NAD<sup>+</sup> et de la L-malate déshydrogénase. La formation de NADH mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la quantité d'acide L-malique initiale.

Les échantillons de vin ou une dilution sont analysés par dosage enzymatique automatisé (accréditation COFRAC N°1-0588) au laboratoire SARCO. De manière plus ponctuelle, les dosages sont réalisés au laboratoire en microplaques à fond plat, transparente aux UV (Greiner Bio-One). Pour cela, les volumes de réaction préconisés par le fournisseur sont divisés par 10 et les absorbances sont déterminées à l'aide d'un lecteur de microplaques Synergy HT (BioTek).

### **2.2.2. Dosages de l'acide citrique et de l'acide acétique**

Lors de la réaction enzymatique, l'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate par la citrate lyase. L'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en présence de NADH par la malate déshydrogénase et la lactate



déshydrogénase, respectivement. La quantité d'acide citrique initialement présente est proportionnelle à la quantité de NADH oxydé.

En milieu réactionnel, l'acide acétique est converti en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA synthétase en présence d'ATP et coenzyme A. Puis, la citrate lyase catalyse la réaction entre l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate pour former de l'acide citrique. L'oxaloacétate nécessaire est apporté par la réaction d'oxydation de l'acide L-malique présent dans le tampon réactionnel en présence de L-malate déshydrogénase et  $\text{NAD}^+$ . La détermination de la quantité d'acide acétique de l'échantillon repose sur la formation de NADH lors de cette dernière réaction.

Ces dosages enzymatiques sont réalisés au laboratoire comme précédemment décrit pour le dosage de l'acide L-malique (Paragraphe 2.2.1).

### **2.3. Dosage des amines biogènes par chromatographie sur couche mince**

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la technique de chromatographie sur couche mince (CCM) développée au laboratoire par Romano *et al.* (2012) pour la détection et la quantification des amines biogènes dans le vin (histamine et putrescine). La CCM est une méthode de séparation physique des constituants en mélange sur une fine couche de silice (phase stationnaire) qui repose sur la différence d'affinités des composés dans un éluant (phase mobile).

Un aliquot de vin (500 $\mu\text{l}$ ) est d'abord traité au charbon actif, la décoloration du vin est instantanée après un mélange par retournement. Après une étape de centrifugation (1000g, 1 min), le surnageant (100 $\mu\text{l}$ ) est transféré dans un tube avec un bouchon à vis contenant 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de bicarbonate de sodium saturée ( $\text{NaHCO}_3$ ) et 200  $\mu\text{l}$  d'une solution de dansyl-chlorure (5mg/ml dans l'acétone) puis mélangé par retournement. La réaction de dérivation se déroule à 55°C pendant 1 heure à l'obscurité. En milieu basique, les amines biogènes sous forme oxydée se combinent au dansyl-chlorure pour former un composé fluorescent détectable à la lumière UV. Les échantillons sont ensuite ramenés à température ambiante et les produits de dérivation sont extraits par ajout de 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure de sodium saturée (NaCl) et 100  $\mu\text{l}$  d'iso-hexane et placé 5



min sous agitation. La séparation des deux phases est réalisée par centrifugation (1000g, 1min). Enfin, 10 µl de la phase organique sont déposés sur une plaque de CCM (TLC Silica gel 60, Merck) à 15 mm du bord de la plaque et en séparant les échantillons d'au moins 14 mm. La plaque est alors déposée dans une cuve de migration saturée par la phase mobile composée de chloroforme : tri-éthylamine (80 : 20). Après environ 90 min de migration (front de migration à 17 cm), la plaque est placée à sécher puis révélée sous lumière UV.

Les gammes étalons de l'histamine et de la putrescine sont préparées dans les mêmes conditions à partir d'échantillons contenant des concentrations connues de chaque amine (5 à 30 mg/l). Enfin, le traitement des images et la quantification des amines biogènes est réalisée à l'aide du logiciel Bio1D.



### 3. Microvinifications

#### 3.1. Mode d'inoculation des bactéries

Inoculation directe : l'inoculation directe consiste à réhydrater les lyophilisats bactériens dans de l'eau distillée stérile pendant 15 min à température ambiante puis à inoculer dans le vin l'équivalent de  $10^6$  ou  $10^7$  cellules/ml.

Inoculation après une étape d'acclimatation : la phase d'acclimatation permet de réduire l'effet de l'inoculation dans le vin sur la viabilité cellulaire. Elle consiste à acclimater les souches lyophilisées dans un milieu composé d'eau et de vin (1 : 1) enrichi en extraits de levure (Energizer®, 60g pour  $10^{10}$  cellules) pendant 12h à 20°C. Puis, les souches sont inoculées dans le vin à  $10^6$  ou  $10^7$  cellules/ml.

#### 3.2. Microvinifications dans un vin " modèle "

La survie à l'inoculation dans le vin et les capacités fermentaires des 44 souches d'*O. oeni* préparées sous forme lyophilisée ont été évaluées lors de microvinifications menées dans un vin " modèle ". Le taux de survie après 24h d'inoculation, la durée de fermentation, la consommation d'acide citrique et la production d'acide acétique ont été déterminées pour chacune des souches.

##### 3.2.1. Préparation d'un vin " modèle "

Pour réaliser les FML dans des conditions similaires, un vin " modèle " obtenu après la FA est préparé au laboratoire à partir de 50 litres de jus de raisin rouge commercial (Marque Jafaden, E.Leclerc). Selon les analyses du jus de raisin réalisées par le laboratoire SARCO, différents paramètres sont ajustés pour mimer un moût composé de glucose-fructose 210 g/l, acide L-malique 4 g/l, azote assimilable 200 mg/l (Thiazote®). Le jus de raisin commercial étant clarifié, la turbidité est également ajustée par addition de Granucel® (cellulose) à 200 mg/l. Ensuite, le moût réparti dans deux cuves inox autoclavées est inoculé à 200 mg/l par ajout d'une levure sèche active Actiflore® F33 préalablement réhydratée et acclimatée selon les recommandations du fabricant (LAFFORT). A la fin de la FA, le vin obtenu est filtré sur

**Tableau 4. Bilan physico-chimique du vin " modèle "**

Titre alcoométrique volumique (TAV) (%vol)	12,16
Sucres réducteurs (g/l)	1,3
pH	3,15
SO <sub>2</sub> libre (mg/l)	-
SO <sub>2</sub> total (mg/l)	30
Acidité totale (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	6,91
Acidité volatile (g/l H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,27
Acide acétique (g/l)	0,24
Acide L-malique (g/l)	4,06
Acide citrique (g/l)	0,37
Acide isobutyrique C <sub>4</sub> (mg/l)	2,3
Acide isovalérique C <sub>4</sub> (mg/l)	21,4
Acide hexanoïque C <sub>6</sub> (mg/l)	63,3
Acide octanoïque C <sub>8</sub> (mg/l)	28,5
Acide décanoïque C <sub>10</sub> (mg/l)	2,3

plaque de cellulose de porosité 0,65  $\mu\text{m}$ , sulfité à 30 mg/l avec une solution de  $\text{SO}_2$  5%, ajusté à pH 3,6 (KOH 5N), aliquoté et conservé à 4°C. Le bilan physico-chimique du vin " modèle " réalisé par le laboratoire SARCO est présenté dans le Tableau 4.

### 3.2.2. Inoculation et suivi de fermentation

Les souches d'*O. oeni* lyophilisées sont inoculées par ensemencement direct dans le vin " modèle " et les suivis de FML sont menés à 20°C, en duplicata. Pour cela, 0,1 g de lyophilisat est réhydraté dans 10 ml d'eau distillée stérile pendant 15 min à température ambiante. Un volume équivalent à une inoculation à  $10^7$  cellules/ml est ajouté à 120 ml de vin ramené à 20°C et incubé le temps de la fermentation à cette même température. Après 24h d'inoculation, les cellules viables sont dénombrées dans 100  $\mu\text{l}$  de vin par microscopie à épifluorescence. Le taux de survie d'une souche, exprimé en pourcentage, correspond au ratio moyen entre la quantité de cellules viables dénombrées à 24h et la quantité de cellules viables inoculées. La cinétique de dégradation de l'acide L-malique est suivie deux à trois fois par semaine, par dosage enzymatique. La durée de la FML totale est ainsi déterminée ; elle est décrite selon deux paramètres : la phase de latence et la FML active. La durée de la phase de latence prend en compte l'erreur type lié au dosage enzymatique et représente la durée nécessaire pour atteindre 3,5 g/l d'acide L-malique dans le vin. Quant à la FML active, elle correspond au temps nécessaire pour atteindre 0,2 g/l d'acide L-malique dans le milieu, phase de latence exclue. Au-delà de 6 semaines de phase de latence, les essais sont arrêtés et les souches en question sont considérées comme étant incapables de débiter la fermentation dans ces conditions. L'ensemble des microvinifications est stoppé après 8 semaines d'incubation. Pour les quelques souches n'ayant pas totalement dégradé l'acide L-malique à ce temps, la durée de FML est extrapolée selon une loi exponentielle. L'acide citrique et l'acide acétique sont dosés en point final ou en cours de fermentation dans le cas de FML languissantes. Ces paramètres sont exprimés en gramme d'acide citrique dégradé ou d'acide acétique produit par gramme d'acide L-malique dégradé.



### **3.3. Microvinifications dans un moût " modèle "**

Ces essais ont été menés dans le cadre de l'étude de la stabilité des plasmides au cours de la vinification et de la comparaison du comportement (développement cellulaire et cinétique fermentaire) des souches avec ou sans plasmides.

Les souches sont cultivées en milieu " jus de raisin " ajusté à pH 3,6 puis inoculées à  $10^3$  cellules/ml dans un moût " modèle " réalisé à partir de jus de raisin rouge commercial ajusté à 210 g/l glucose : fructose (1 : 1), 3 g/l acide L-malique, 20 mg/l  $SO_2$  et pH 3,6. La FA est initiée par l'inoculation de la levure sèche active F33 à 200 mg/l préparée selon les recommandations du fournisseur (LAFFORT), menée à 25°C et suivie quotidiennement par la mesure de la perte de poids associée au dégagement de  $CO_2$ . A la fin de la FA, les vins ont été placés à 20°C pour mener la FML. La dégradation de l'acide L-malique déterminée par dosage enzymatique et la croissance cellulaire évaluée par dénombrement sur milieu solide " jus de raisin " ont été suivies trois fois par semaine.



## 4. Techniques de biologie moléculaire

### 4.1. Extraction des acides nucléiques

#### 4.1.1. Extraction de l'ADN génomique, protocole classique

L'ADN total des bactéries lactiques est purifié à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). Cette méthode rapide permet l'obtention d'acide nucléique de bonne qualité directement utilisable pour différentes applications de biologie moléculaire.

La culture bactérienne en fin de phase exponentielle est centrifugée à 10000g pendant 5 min puis le milieu de culture est éliminé. Le culot cellulaire est repris dans 600 µl d'une solution d'EDTA 50 mM pH 8 additionné de 10 mg/ml de lysozyme et incubé une heure à 37°C pour permettre la dégradation des parois bactériennes. Après une nouvelle centrifugation à 10000g pendant 2 min, le surnageant est éliminé et les protoplastes sont repris délicatement dans 600 µl de tampon de lyse (Nuclei Lysis Solution). L'échantillon est alors incubé pendant 5 min à 80°C pour faciliter la lyse des cellules puis ramené à température ambiante. L'ajout de 3 µl d'une solution de RNase A suivi d'une incubation de 30 min à 37°C permet d'éliminer toute trace d'ARN. Les débris cellulaires sont précipités par ajout de 200 µl de solution de précipitation (Protein Precipitation Solution) et par homogénéisation du mélange à l'aide d'un vortex pendant 20s. L'échantillon est ensuite placé 5 min dans la glace, puis centrifugé à 10000g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol, l'ADN est précipité en réalisant plusieurs mélanges par inversion. Après centrifugation, le culot est lavé avec 600 µl d'éthanol 70%, et à nouveau centrifugé. Finalement, l'ADN est séché à l'air libre pendant 15 min puis repris dans 20 µl d'eau ppi (pour préparation injectable) et réhydraté pendant une nuit à 4°C.

#### 4.1.2. Extraction de l'ADN génomique, protocole adapté au milieu vin

L'ADN des microorganismes présents dans le vin est purifié à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique précédemment utilisé. Quelques modifications sont apportées au



protocole ci-dessus afin d'optimiser l'extraction du matériel génétique à partir de la matrice " vin ".

Un volume de 10 ml de vin est prélevé et centrifugé 5 min à 10000g. Le culot est lavé délicatement dans 1 ml de tampon TE pH 8 (Tris 10 mM ; EDTA 1 mM). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 300 µl d'une solution d'EDTA 50 mM pH 8. La suspension est transférée dans un tube à vis contenant 200 µl de billes de verre (diamètre 0,1 mm) pour l'étape de lyse cellulaire. Celle-ci consiste à effectuer une lyse mécanique de 45s à une vitesse de 6,5 m/s à l'aide d'un homogénéisateur à haute vitesse FastPrep®-24 (MP Biomedicals) suivie d'une lyse physique par choc thermique en plaçant l'échantillon 1 min dans la glace. Ce cycle est répété 5 fois avant d'ajouter 300 µl de tampon de lyse (Nuclei Lysis Solution) et 200 µl de solution de précipitation (Protein Precipitation solution). La suspension est ensuite mélangée à l'aide d'un vortex pendant 20s, conservée 5 min dans la glace et centrifugée 3 min à 10000g. Le surnageant est récupéré puis une solution de PVP 10% (polyvinylpyrrolidone) est additionné à 1% final pour éliminer les composés phénoliques. L'échantillon est alors, mélangé 10s à l'aide d'un vortex et centrifugé 2 min à 10000g. Le surnageant est transféré dans un tube contenant 500 µl d'isopropanol et l'ADN est précipité en réalisant plusieurs mélanges par inversion puis maintenu 15 min à température ambiante. Suite à une étape de centrifugation (15 min ; 10000g), le culot d'ADN est lavé par ajout de 300 µl d'éthanol 70% puis centrifugé 2 min à 10000g. Une fois l'éthanol retiré, le culot est séché à l'air libre pendant 15 min puis repris dans 20 µl d'eau ppi contenant 0,6 µl de RNase A et réhydraté pendant une nuit à 4°C.

#### **4.1.3. Extraction de l'ADN génomique, technologie Whatman FTA**

La technologie Whatman FTA brevetée est une technique simple et rapide pour l'extraction, la purification et la conservation des acides nucléiques de diverses matrices. Elle consiste à déposer l'échantillon sur une carte FTA contenant l'ensemble des composés chimiques nécessaires à la lyse cellulaire, la dénaturation des protéines et la protection du matériel génétique contre les nucléases, l'oxydation et les rayons ultra-violet. Les acides nucléiques libérés sont piégés dans les fibres de la matrice et peuvent être directement utilisés pour diverses applications de biologie moléculaire et stockés à température ambiante pour de longues périodes.

**Tableau 5. Liste des amorces utilisées.**

Séquence cible (fonction)	Amorce	Séquence (5' --> 3')	Amplicon (pb)	Références
<b>Identification des espèces</b>				
<i>ADNr 16s</i> (ADN ribosomique 16S)	BSF8 BSR1541	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1500	Edwards <i>et al.</i> , 1989
<i>mleA</i> (Enzyme malolactique)	OO1 OO2	GTGCCGCTTTTTGGATATTA AGCAATTTTATCTTTATAGCT	430	Divol <i>et al.</i> , 2003
<b>PCR RAPD</b>				
Coc-On2	Coc On2	AGCAGCGTGG ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT		Reguant <i>et al.</i> , 2003
<b>Gènes cibles de l'analyse MLST</b>				
<i>gyrB</i> (Gyrase, subunit β)	gyrB-1 gyrB-2	CTTCGGTTGTTAATGCTTTGTC CAACTTGGTTTTGTCTGCC	674	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<i>g6pd</i> (glucose-6-phosphate déshydrogénase)	g6pd-1 g6pd-2	TTATATGTCTGTTGCTCCTCGT CCGTTCTGATGTA AAAAAGG	669	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<i>pgm</i> (phosphoglucomutase)	pgm-1 pgm-2	ATATCTGCCGAAGTGCTAAGAG AGCAGCAATTTGATTCCAG	654	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<i>dnaE</i> (DNA polymérase III, subunit α)	dnaE-1 dnaE-2	CGTATATAGAGCGCTTTGCC CGTTCTTATCGCGAGTTGTAC	714	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<i>purK</i> (Phosphoribosylamino- imidazole carboxylase)	purK-1 purK-2	TGGTTATCATGTTGGTATTTGG GAAGCAGGAGCATAGGAAAGA	597	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<i>rpoB</i> (RNA polymérase, subunit β)	rpoB-1 rpoB-2	CGATATTCTCCTTTCTCCAATG CTTTAGCGATCTGTTCCAATG	665	Bilhère <i>et al.</i> , 2009
<b>Etude des plasmides de type pOENI-1</b>				
ORF 8 (Perméase TauE)	8a 8b	TAAGCAAACGGGGTCAACTC TCAGGCCGAGGATCAATAAC	142	Cette étude
ORF 11 (Protéine OYE)	oye1 oye2	AGTAGTTATCCGCAATGA ATGAATGGCTCCTTAGCATA	602	Cette étude
ORF 15 (Protéine RepA)	repA1 repA2	ATCGGCTCGAATATTCTCTCAA CGTATTCTCTAGCCGCTTGTTT	911	Cette étude
ORF 20 (Nickase TraA)	orf20a orf20b	AGTTAAGAACTATCGTAAGTCC AACAGGATCATAGTACATCAC	821	Cette étude
ORF 15_ORF 1	2repA NC1	ATCACCTAGTAGACGAAGAG GGTAGGCAGTTCTAATC	6464	Cette étude
ORF 20_ORF 10	orf20a orf10	AGTTAAGAACTATCGTAAGTCC TACTGGCCTCCTACTGAAC	9848	Cette étude
ORF 10_ORF 15	repA2 NC3	CGTATTCTCTAGCCGCTTGTTT GCATTGACTTTGCGGAATG	5199* 8765*	Cette étude
ORF 11_ORF 13	orf13-2 oye1	TACAGCATACACTCACAGCA AGTAGTTATCCGCAATGA	2376* 5942*	Cette étude
OEOE_0812	0812a 0812b	GATTATTACCAATTCGGCTG ACGCCGAAATAATGTAG	540	Cette étude
<b>Etude des génomes</b>				
<i>araC</i> (Régulateur de transcription)	araC1 araC2	TGTCTTCTCGAAGCGAGTCT TGGAATGAAGTCAATTGAATCAGCA	506	Cette étude
<i>nqr</i> (NADH quinone réductase)	nqr1 nqr2	AACCACGACCGGCATTAAT AAGTTCACCAGGACACGACC	838	Cette étude
<i>Xyl</i> (L-xylulose-5-phosphatate 3-épimérase)	xyl1 xyl2	AGACAGTCCCGGCTTGATTG CCTCTGTTTGATGCCAAC	736	Cette étude

\*, taille d'amplicon variable selon le plasmide considéré.

Dans cette étude, la technologie Whatman FTA est utilisée pour des vérifications rapides par PCR, à partir de colonies ou culture en milieu liquide. Les colonies d'*O. oeni* sont reprises dans 20 µl d'eau ultra pure stérile puis un volume de 8 µl de la suspension est déposé sur la carte FTA. Pour les cultures en milieux liquides, une dilution au demi limitant les inhibiteurs apportés par les jus de fruits, est nécessaire avant le dépôt sur carte. Après un temps de séchage de 30 min à température ambiante, une pastille de 1,2 mm de diamètre contenant l'échantillon est découpée à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Uni-Core Punch) et déposée dans un tube PCR. Les acides nucléiques sont alors purifiés par ajout de 100 µl de tampon de purification (FTA Purification Reagent) avec un temps de contact de 5 min. Enfin, deux lavages à l'eau ultra pure sont réalisés de la même façon. Le mix PCR peut alors être directement ajouté.

## 4.2. Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne ou " PCR " (Polymerase Chain Reaction) est une méthode permettant d'amplifier *in vitro* et de manière exponentielle un fragment d'ADN spécifique. Elle repose sur l'hybridation de deux courtes séquences oligonucléotidiques, appelées " amorces ", sur chacun des deux brins d'ADN du fragment cible, suivie d'une étape d'élongation des amorces par une ADN polymérase, générant ainsi une nouvelle matrice. La PCR se déroule donc généralement en 3 étapes répétées 30 à 40 fois : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces avec leur séquence complémentaire et élongation par l'ADN polymérase.

La liste des amorces utilisées au cours de l'étude est présentée dans le Tableau 5. Dans la suite du document, les couples d'amorces utilisés pour chaque PCR sont indiqués dans le texte.

### 4.2.1. PCR classique

Le mélange réactionnel classique, utilisé lors de l'étude, est préparé dans un volume final de 20 µl contenant 5 pmoles de chaque amorce, environ 25 ng de matrice ADN et 4 µl de mix " à façon " (Taq-&GO™ Mastermix, MP Biomedicals).

**Tableau 5 (suite). Liste des amorces utilisées.**

Séquence cible (fonction)	Amorce	Séquence (5' --> 3')	Amplicon (pb)	Références
<b>Gènes des voies d'altération</b>				
<i>hdc</i> (Histidine decarboxylase)	HDC 3 oeniHDC2	GATGGTATTGTTTCKTATGA CCCGTGTTTCTTTGTCACCT	2300	Coton <i>et al.</i> , 2010 Cette étude
<i>tdc</i> (Tyrosine decarboxylase)	TDC2 TDC5	ACATAGTCAACCATRTTGAA CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	1133	Coton <i>et al.</i> , 2010
<i>odc</i> (Ornithine decarboxylase)	ODC1 ODC2	NCAYAARCAACAAGYNGG GRTANGGNTNNGCACCTTC	900	Coton <i>et al.</i> , 2010
<i>ptc</i> (Putrescine transcarbamylase)	PTC1 PTC2	GGWCAAATTCAIYTIGG CCRTACCAWACATGIGTRTA	500	Cette étude
<i>arcA</i> (Arginine déiminase)	ADIOO3' ADIOO5'	ATGATGGATAAGAAAGTTCC CTATTTTTTAATATCATCACG	1245	Divol <i>et al.</i> , 2003
<i>gtf</i> (glucosyltransférase)	PF1 PF8	GATTGTAATAAAATAAAAAGACCC CATATGATAACACGCAGGGC	950	Dols-Lafargue <i>et al.</i> , 2008
<b>PCR spécifique de la souche S11</b>				
(Endonuclease, type II)	S11f qS11r	AGGCAAAGAAGAAGAATTAGC ACGCTGTGGAATCCTTTGTC	831	Cette étude
<b>PCR quantitative</b>				
ORF 8 (Perméase TauE)	8a 8b	TAAGCAAACGGGGTCAACTC TCAGGCCGAGGATCAATAAC	142	Cette étude
ORF 11 (Protéine OYE)	oyeQ1 oyeQ2	TAAGGGATTTGAAGGCCAACT TTGAAGAATTGCTTTAGCACCA	106	Cette étude
<i>rpoB</i> (RNA polymerase, subunit β)	rpoBqFO rpoBqRO	ATGGAACGTGTTGTCCGCGA GGATTGGTTTGATCCATGAA	148	Cette étude

Toutes les réactions PCR sont réalisées en utilisant un appareil thermocycler iCycler (Bio-Rad). Le programme comprend une étape initiale de dénaturation de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles répétant 30s à 95°C, 30s entre 50 et 60°C (selon les couples d'amorces) et 1 min par kilobase à 72°C, puis une dernière élongation de 10 min à 72°C.

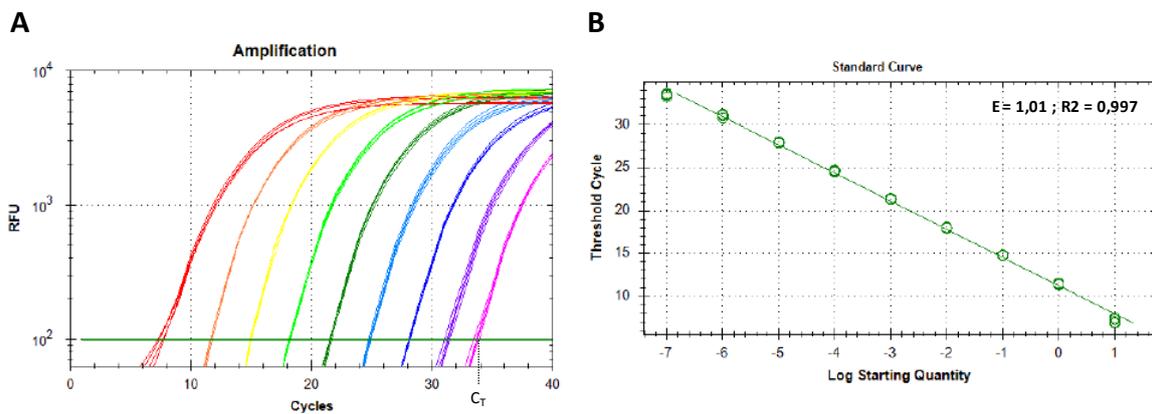
#### 4.2.2. PCR sur colonies

La technique PCR étant extrêmement sensible, elle peut être réalisée directement à partir d'une biomasse, permettant ainsi l'analyse rapide de nombreuses colonies. Cela consiste à suspendre chacune d'elles dans 100 à 200 µl d'eau ppi, puis à congeler la suspension à -20°C pour lyser une partie des cellules et rendre l'ADN plus accessible à la polymérase. En conservant l'échantillon à cette température, les analyses par PCR peuvent être différées et regroupées selon les expérimentations menées. Enfin, 1 µl de la suspension utilisée comme matrice ADN est additionné au mélange réactionnel ; la réaction PCR est menée selon le protocole classique.

#### 4.2.3. PCR RAPD multiplex

La PCR RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) génère un profil de séquences amplifiées grâce à l'utilisation d'une seule amorce peu spécifique qui s'hybride aléatoirement sur différentes positions du génome et permet ainsi de typer les souches d'*O. oeni*. La PCR RAPD multiplex développée par Reguant et Bordons (2003) est une méthode discriminante basée sur l'utilisation de deux amorces. La première est une amorce universelle courte (Coc) et la seconde est une amorce spécifique de l'espèce *O. oeni* ciblant le gène de l'enzyme malolactique (On2) (Tableau 5).

Le mélange réactionnel est préparé dans un volume final de 25 µl contenant 50 pmoles de l'amorce Coc, 25 pmoles de l'amorce On2, environ 25 ng de matrice ADN et 4 µl de mix " à façon " (Taq-&GO™ Mastermix, MP Biomedicals). Le programme comprend une étape initiale de dénaturation de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles répétant 1 min à 95°C, 1 min à 40° et 2 min à 72°C, puis une dernière élongation de 10 min à 72°C.



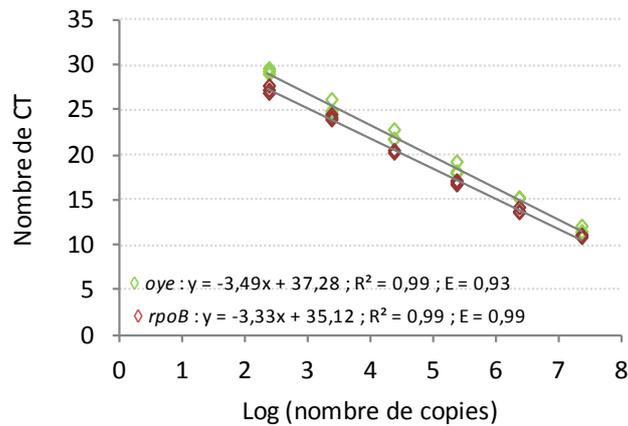
**Figure 14. Réalisation d'une courbe "standard".** Dans cet exemple, 9 dilutions décimales de l'échantillon initial ont été analysées en 4 répétitions. **(A)** Les courbes de quantification obtenues correspondent à l'intensité de la fluorescence émise (RFU) en fonction du nombre de cycle ( $C_T$ ). A partir de ces courbes, une valeur de  $C_T$  est déterminée et attribuée à chaque quantité initiale de matrice. **(B)** La courbe "standard" représente chaque  $C_T$  en fonction du log décimal de la quantité initiale de matrice. La quantité d'ADN ou cellules d'un échantillon donné peut être déterminée à l'aide de la courbe "standard". (Source Bio-Rad)

#### 4.2.4. PCR quantitative en temps réel

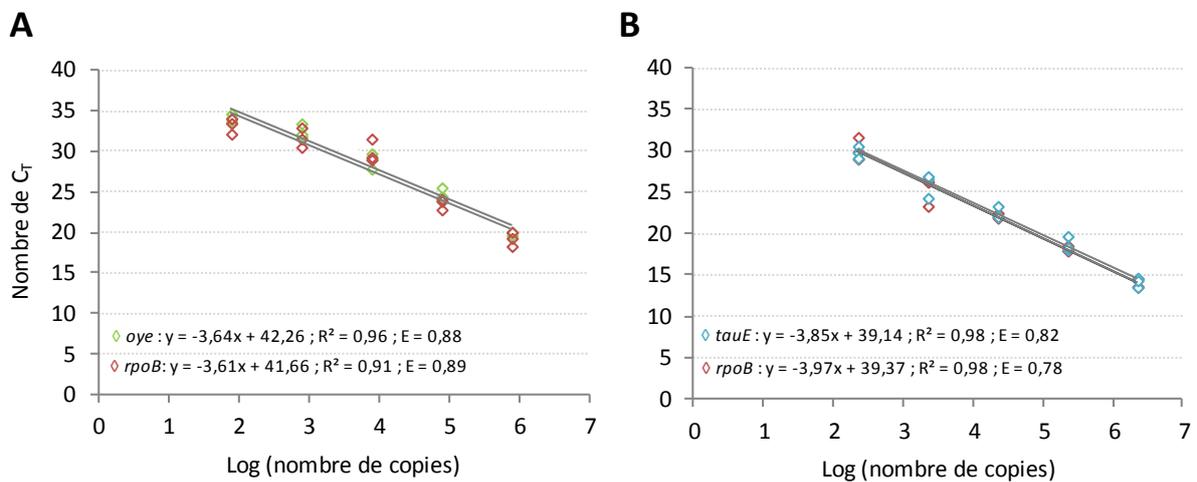
La technologie de la PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique mais permet également la détection et la quantification en continu d'un signal de fluorescence, proportionnel à la quantité d'amplicons formés. Cette approche nécessite un thermocycleur associé à un système spécifique permettant l'excitation du fluorochrome et la quantification de la fluorescence émise ; nous disposons pour cela, de l'appareil CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Dans cette étude, le BRYT Green® (Promega), fluorochrome intercalant non spécifique de nouvelle génération est utilisé. Suite à une excitation par rayonnement ultraviolet (UV), l'ADN synthétisé, marqué par le BRYT Green® peut ainsi être quantifié par mesure de la fluorescence.

Pour évaluer la concentration d'ADN ou la concentration cellulaire d'un échantillon, il est nécessaire d'établir des courbes standardisées à l'aide d'échantillons dont la quantité initiale en ADN ou cellules est connue. Chaque réaction d'amplification permet de déterminer une valeur de  $C_T$ , unité de quantification, propre à chaque quantité d'ADN ou cellules (Figure 14). Le  $C_T$  se définit comme étant le nombre de cycle nécessaire pour atteindre une fluorescence émise, significativement différente de celle du bruit de fond. Il correspond au point d'intersection entre la ligne de base de fluorescence et la courbe expérimentale. C'est seulement au cours de la phase exponentielle que les valeurs de  $C_T$  sont proportionnelles à la quantité de matrice initiale (Figure 14). Une courbe "standard" est caractérisée selon son coefficient de régression ( $R^2$ ) et par son efficacité de PCR ( $E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$ ). En théorie, les critères de validité d'une gamme "standard" sont  $R^2 \geq 0,985$  et  $0,85 \leq E \leq 1$ . Lors de ces travaux, différentes courbes standardisées ont été construites pour chaque gène cible et chaque type de matrices dont ont été extraits les ADN (milieu de culture ou vin). Les courbes ont été obtenues suite à trois expériences indépendantes, chacune réalisées en triplicata et sont présentées dans les Figure 15 et Figure 16.

Le mélange réactionnel pour une analyse quantitative contient 10 pmoles de chaque amorce, environ 10 ng de matrice d'ADN, 10  $\mu$ l de mix "à façon" GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), qsp 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ppi. Le programme PCR comprend une étape initiale de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 30s à 95°C, 30s à 60°C et 30s à 72°C ; les



**Figure 15. Courbes " standard " des gènes *oye* et *rpoB* pour la détermination du nombre de copies de plasmides par cellule.** Les courbes " standard " ont été construites à partir de dilutions décimales ( $2,3 \times 10^2$  à  $2,3 \times 10^7$  copies) de l'ADN génomique de la souche ATCC BAA 1163 contenant le gène *oye* et *rpoB* en une seule copie. Chaque échantillon préparé en triplicata est amplifié par PCR *oye* (*oye*Q1-*oye*Q2) et PCR *rpoB* (*rpoB*qFO-*rpo*qRO). Pour chaque gène, les valeurs de  $C_T$  obtenues sont reportées en fonction du logarithme du nombre de copies initiales. E, efficacité PCR ;  $R^2$ , coefficient de régression.



**Figure 16. Courbes " standard " des gènes *oye*, *tauE* et *rpoB* pour leur détection et leur quantification dans le vin.** Les courbes " standard " ont été construites à partir des ADN génomiques extraits de dilutions décimales ( $10^2$  à  $10^7$  copies/ml), réalisées en triplicata, des souches ATCC BAA 1163 (A) ou S24 (B) inoculées dans un vin rouge stérilisé par filtration. Ces souches portent une copie unique des gènes *oye* et *tauE*, respectivement. E, efficacité PCR ;  $R^2$ , coefficient de régression.

mesures de fluorescence sont réalisées lors de chaque période d'élongation. A la fin du cycle PCR, une courbe de fusion est établie afin de déterminer la température de demi-dénaturation (ou  $T_m$ ) des amplicons et vérifier leur spécificité. Cette dernière étape consiste en la dénaturation des produits formés par une augmentation progressive de la température de 70°C à 90°C (0,5°C toutes les 5s).

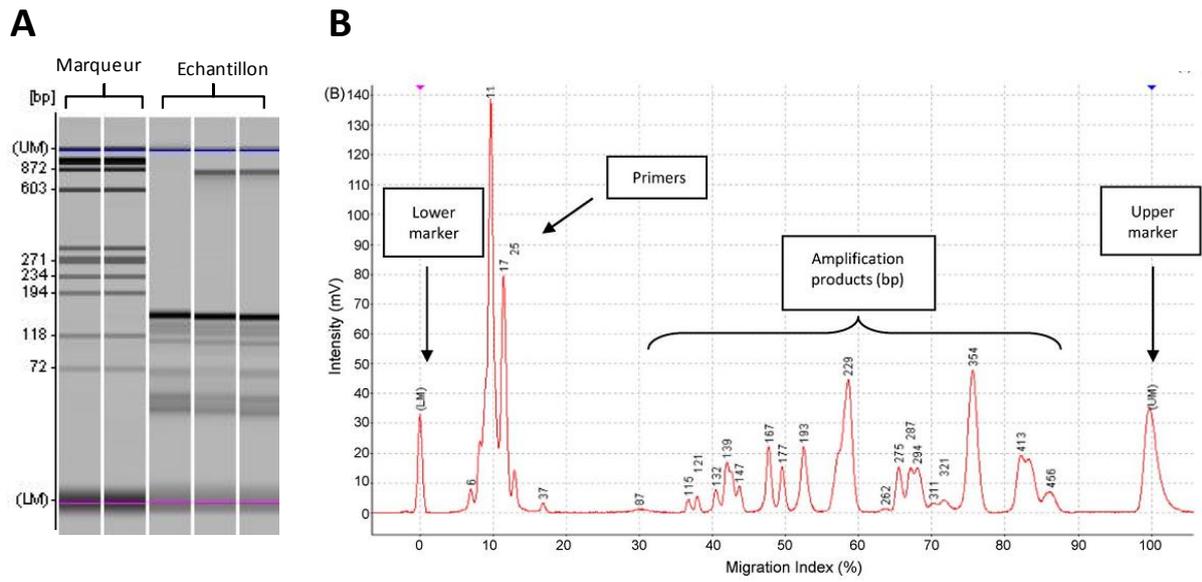
### **4.3. Migration des acides nucléiques par électrophorèse**

#### **4.3.1. Electrophorèse en champs constant sur gel d'agarose**

L'électrophorèse classique sur gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques selon leur taille grâce à un courant électrique. Les ADN chargés négativement migrent alors vers l'anode selon leur poids moléculaire. L'agarose (1,2% p/v) est dissout à chaud dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2M, Acétate 1M, EDTA 0,05M pH 8). Un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET) fluorescent sous lumière UV, est ensuite ajouté à 0,2 µg/ml. Après polymérisation, le gel est déposé dans un cuve de migration contenant du tampon TAE 1X puis les échantillons d'ADN additionnés de 10% (v/v) de bleu de charge (glycérol 50%, TE 50%, bleu de bromophénol 0,25%) sont déposés dans les puits. La migration se déroule généralement à 90 V pendant 45 min. Les ADN sont révélés par exposition à la lumière UV (Système d'imagerie Infinity Capt, Fischer Scientific, Bioblock).

#### **4.3.2. Electrophorèse capillaire à puce**

Lors de cette étude, le système MultiNA (Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis, Shimadzu) est utilisé pour l'analyse rapide de nombreux produits d'amplification. Le MultiNA est un système d'électrophorèse capillaire dont le principe est identique à celui de l'électrophorèse en champ constant sur gel d'agarose. La principale différence repose sur la miniaturisation, l'automatisation de la migration et la visualisation des échantillons par électrophorégramme. La migration de l'échantillon se déroule au travers d'un capillaire contenant un tampon de séparation spécifique de la taille et du type de matrice (ADN ou ARN). Un fois injecté, l'échantillon marqué par un fluorochrome contenu dans le tampon de séparation est soumis à un champ électrique élevé provoquant sa



**Figure 17. Données générées par le logiciel MultiNA viewer. (A) Exemple d'un gel numérique (B) Exemple d'un électrophorégramme (Adapté de Bekaert *et al.*, 2009).**

migration dans le capillaire. Lors de son passage au travers d'un système émetteur/détecteur à fluorescence, la lumière émise par la molécule marquée est mesurée, enregistrée et transcrite en un signal visible sous forme de pic dans un électrophorégramme et sous forme de bande dans une image numérique de gel (Figure 17).

Ce système automatisé nécessite seulement la préparation des réactifs et échantillons (dilutions éventuelles). Le kit MultiNA DNA 1000 (Shimadzu) composé d'un tampon de séparation spécifique des fragments de 100 à 1000 pb et d'un calibrateur est utilisé. Ce dernier est prêt à l'emploi. Additionné à chaque échantillon lors de l'analyse, le calibrateur contient deux types de molécules de faible et haut poids moléculaire permettant la normalisation de la migration. Le fluorochrome SYBR Gold® (Invitrogen) dilué 100 fois dans du tampon TE pH 8 est ajouté à une concentration finale 1X dans le tampon de migration. Enfin, le marqueur de poids moléculaires phiX174-HaeIII digest (Promega) est dilué 50 fois dans du TE pH 8. Les échantillons et réactifs installés dans le multiNA et les données informatiques enregistrées dans le logiciel " MultiNa Control ", l'analyse peut être lancée. Pour visualiser, analyser et modifier les rapports d'analyses, nous disposons du logiciel " MultiNA Viewer " (Figure 17).

#### 4.3.3. Technique REA-PFGE

L'électrophorèse en champs pulsé est utilisée pour la séparation des fragments d'ADN de grande taille (>50kb) ce que ne permet pas l'électrophorèse classique en gel d'agarose. Cette technique repose sur une alternance de l'orientation du champ électrique au cours du temps, facilitant la migration et la séparation des molécules d'ADN de grande taille dans le gel d'agarose. Les méthodes de purification classiques provoquant parfois une fragmentation mécanique de l'ADN ne sont toujours adaptées à l'électrophorèse en champs pulsé. Pour obtenir des molécules d'ADN intègres, les cellules sont incluses dans des petits blocs d'agarose puis soumises à différents traitements de purification.

Dans cette étude, la migration en champs pulsé des fragments d'ADN génomique obtenus par digestion enzymatique (REA-PFGE, Restriction Enzyme Analysis – Pulse Field Gel Electrophoresis) est utilisée pour le typage des souches d'*Oenococcus*. Le protocole suivi est celui mis au point au laboratoire (Gindreau *et al.*, 1997).



### Préparation des cellules en bloc d'agarose

La biomasse bactérienne obtenue sur milieu gélosé est récupérée à l'aide d'un râteau par ajout de 4 ml de tampon TE (Tris 10 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8). La densité optique de la suspension est déterminée à 600 nm, puis un volume contenant environ  $5 \times 10^8$  cellules est prélevé et centrifugé 5 min à 10000g. Après élimination du surnageant, deux lavages successifs dans 1,5 ml de TE sont réalisés. Le culot est repris dans 50  $\mu$ l de tampon T<sub>100</sub>E (Tris 10mM ; EDTA 100mM ; pH 7,5) et placé au bain-marie à 50°C. Puis, 50  $\mu$ l de T<sub>100</sub>E contenant 1% (p/v) d'agarose à bas point de fusion (Chromosomal Grade Agarose, Bio-Rad) est additionné et l'échantillon homogénéisé est coulé dans un moule adapté. Les blocs d'agarose (plugs) formés à 4°C pendant 15 min sont démoulés et peuvent ainsi être conservés plusieurs jours à 4°C.

### Purification de l'ADN

Les plugs contenant les cellules entières sont incubés 3h à 37°C dans 1 ml de T<sub>100</sub>E contenant 10 mg/ml de lysosyme (Sigma-Aldrich). Puis, ils sont transférés dans 1 ml de T<sub>100</sub>E contenant 2 mg/ml de pronase (Sigma-Aldric) et 1,5% (p/v) de N-laurylsarcosine (Sigma-Aldric) et incubés 16h à 37°C. A la fin de cette étape, la paroi et la membrane cellulaire ont été dégradées et l'ADN génomique se trouve sous forme libre dans l'agarose. L'échantillon peut ainsi être conservé pour plusieurs mois à 4°C.

### Digestion enzymatique de l'ADN

Avant l'étape de digestion enzymatique, les plugs sont lavés quatre fois dans 1,5 ml de TE pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce. La moitié du plug rincé brièvement à l'eau ultra pure est transféré dans 100  $\mu$ l d'un mélange réactionnel contenant 10 unités de l'enzyme de restriction NotI, SfiI ou ApaI préparé selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs). Le mélange est incubé 16h à 25°C lors de l'utilisation des enzymes NotI et ApaI et à 50°C pour le cas de SfiI.

### Migration électrophorétique en champs pulsé et révélation des profils de restriction

Immédiatement après l'étape de digestion enzymatique, le demi-plug est rincé dans du TE pH 8 et déposé délicatement sur gel d'agarose spécial champs pulsé 1% (Pulse Field

**Tableau 6. Conditions de migration des électrophorèses par champ pulsé.**

	Enzyme de restriction		
	NotI	Apal	Sfil
Temps de pulse (sec)	1 - 25	1 - 6	5 - 45
Temps de migration (h)	22	21	24
Voltage (V/cm)	6	6	4,5
Angle (°)	120	120	120

Certified Agarose, Bio-Rad). Un marqueur de poids moléculaire est également déposé (MidRange PFG Marker II, New England Biolabs) puis les puits sont scellés par addition de gel d'agarose liquide 1%. La migration se déroule dans un tampon TBE 0,5X (TBE 10X, Tris 890 mM ; acide borique 890 mM ; EDTA 20mM pH 8) à 14°C selon les conditions présentées Tableau 6. Enfin, le gel est coloré dans 100 ml de TBE 0,5X supplémenté de 0,7µg/ml BET (Eurobio) pendant 15 min. Les profils de restriction sont visualisés sous lumière UV (Système d'imagerie Infinity Cpat, Fischer Scientific, Bioblock). Selon l'intensité de la coloration, le gel peut de nouveau être coloré ou décoloré dans des bains successifs d'eau ultra pure.

## 4.4. Séquençage de l'ADN

### 4.4.1. Séquençage de fragments d'ADN par la méthode de Sanger

La méthode de Sanger est ici utilisée pour le séquençage de courts fragments d'ADN (<1000 pb) dans le cadre d'une analyse Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Paragraphe 5.2.2). Les produits PCR obtenus et les amorces sont préparés et envoyés selon les recommandations de la société GATC Biotech. La lecture et l'analyse des séquences sont effectuées à l'aide du logiciel Bioedit ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)).

### 4.4.2. Séquençage des génomes complets par la technologie 454

Le séquençage de 19 génomes d'*O. oeni* a été réalisé à la plateforme génomique de la Génopole de Toulouse Midi-Pyrénées (<http://genomique.genotoul.fr>) (Tableau 3). Le fonctionnement de la plateforme nous a permis de participer aux différentes étapes du séquençage, de la préparation des ADN à la réaction de séquençage, et d'acquérir une formation à la technologie 454.

#### Préparation des ADN génomiques

Au laboratoire, la concentration et la pureté des ADN génomiques de chaque souche sont évaluées par mesure d'absorbance au spectrophotomètre NanoVue (Fischer Scientific), un balayage spectral est effectué entre les  $DO_{230nm}$  et  $DO_{320nm}$ . Le rapport  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  traduisant la proportion d'acides nucléiques et protéines doit être compris entre 1,7 et 2, un ratio inférieur à 1,7 signe une contamination protéique de la préparation. La qualité des ADN



est vérifiée par migration des échantillons sur gel d'agarose 1%. L'observation d'une bande à hauteur du fragment de 23 kb du marqueur Lambda DNA - HindIII Digest (New England Biolabs) et l'absence d'un smear dénote l'intégrité de l'ADN génomique. Un volume contenant 1 µg d'ADN est alors envoyé à la plateforme génomique.

#### Traitement des ADN et séquençage

A la plateforme, les ADN sont, de nouveau, quantifiés par dosage au picogreen, fluorochrome spécifique de l'ADNdb. Par la suite, le protocole suivi est adapté à la technologie Titanium et à l'utilisation du séquenceur GS FLX 454 de Roche. Ainsi, les étapes de préparation des libraires d'ADN simple brin, amplification clonale des fragments d'ADN, préparation des produits PCR au séquençage, préparation de la plaque de séquençage et la réaction de séquençage sont réalisées selon les recommandations du fournisseur (Roche) (Etude bibliographique, Figure 10).



## 5. Analyses bioinformatiques

### 5.1. Analyse d'une séquence nucléique et protéique

#### Pourcentage en bases GC ou coefficient de Chargaff

Le pourcentage GC (%GC) correspond à la proportion des bases guanine et cytosine dans une séquence d'ADN. Cette mesure est un des paramètres utilisés en taxonomie bactérienne. D'un point de vue génomique, le %GC moyen est un trait spécifique à l'espèce. Malgré une certaine hétérogénéité du %GC contenue dans une séquence, une variation importante de ce paramètre suggère souvent la présence d'éléments génétiques acquis par transfert horizontal. Le %GC de séquences relativement courtes sont obtenues facilement avec le logiciel Bioedit.

#### Recherche de séquences répétées

Les séquences répétées sont les motifs identifiables sur le génome les plus courants. Ce sont des séquences plus ou moins longues de deux à plusieurs dizaines de paires de bases qui correspondent à des erreurs survenues lors de la réplication de l'ADN ou à des signatures génétiques à l'origine d'interaction ADN-ADN ou ADN-protéine comme c'est le cas des origines de réplication. La recherche des séquences répétées a été effectuée avec le logiciel Etandem (<http://bioweb2.pasteur.fr>).

#### Prédiction des ORFs

Une ORF (Open Reading Frame) ou cadre ouvert de lecture correspond à une séquence d'ADN délimité par un codon start et un codon stop, codant potentiellement une protéine. Les ORFs des séquences plasmidiques étudiées au cours de cette étude ont été prédites à l'aide des logiciels GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMarket/>) (Besemer *et al.*, 2005) and Glimmer v3.02 (<http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/>) (Delcher *et al.*, 1999) basés sur la reconnaissance des bases codantes selon le modèle de Markov.



### Prédiction des fonctions protéiques

Une fonction protéique a été prédite pour chaque ORF identifiée à l'aide de diverses analyses. Dans un premier temps, des séquences protéiques homologues ont été recherchées dans la base de données internationale NCBI grâce à l'outil d'alignement BLASTp ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)). Dans la plupart des cas, les informations apportées par cette analyse se sont avérées suffisantes pour prédire une fonction protéique. Dans les cas contraires, l'appartenance à une famille protéique déjà caractérisée a été recherchée dans les bases de données InterPro grâce à l'outil Interproscan ([www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/)) (Hunter *et al.*, 2012) et COG grâce à l'outil COGnitor (Clusters of Orthologous Groups of proteins) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>) (Tatusov *et al.*, 1997).

## **5.2. Analyse des structures de population**

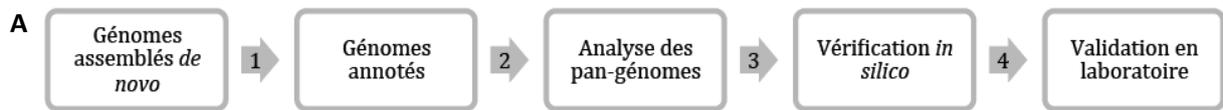
### **5.2.1. Analyse des profils de restriction obtenus par REA-PFGE**

Les profils de restriction des ADN génomiques obtenus par PFGE ont été analysés avec le logiciel Bionumerics 5.1 (Applied Maths). Pour l'analyse de données binaires ou la comparaison de profils électrophorétiques, il est communément construit des dendrogrammes, diagramme reposant sur les distances séparant les taxons. Un dendrogramme basé sur les profils de restriction NotI-PFGE des souches a été généré par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic means) avec le coefficient de similarité Dice et un seuil de tolérance de 2,3% (Bilhère *et al.*, 2009).

### **5.2.2. Analyse MLST**

L'analyse MLST (Multi Locus Sequence Typing), basée sur les polymorphismes de séquence de plusieurs loci, permet de construire une phylogénie, d'étudier la structure de population et de typer les souches bactériennes. Nous l'avons utilisé ici pour différencier les souches avec un profil REA-PFGE identique et construire un arbre phylogénétique incluant la totalité des séquences génomiques récemment publiées (Borneman *et al.*, 2012a).

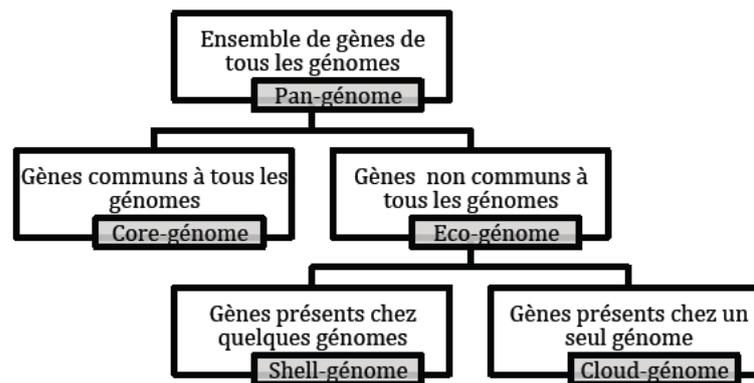
D'après de précédentes études, deux gènes ont été ôtés de l'analyse MLST proposée par Bilhère *et al.* (2009) : le gène *ddl* codant une ligase est extrêmement conservé et donc



**B**

Etape	Outil	Tâche
1	RAST	Annotation des génomes assemblés.
2	gbk2pangenomes*	Extraction des annotations en genbank.
	rast2pangenomes* pangenomes*	Extraction des annotations en rast. Identification des parties du pan-génome à partir d'un groupe de génomes annotés.
3	ClustalW cons	Alignement de séquences nucléiques et protéiques. Création d'une séquences consensus à partir d'un alignement multiple.
	makeblastdb	Création d'une base de données de BLAST.
	blastn	Recherche d'alignements locaux de séquences.
	blast2fasta*	Extraction de séquence en format FASTA à partir d'une sortie de BLAST.
	MAUVE	Visualisation de contigs alignés par rapport à une référence.
4	Artemis DNAPlotter	Illustration de chromosomes bactériens.
	fasta2primer3*	Adaptation de séquences fasta au format de Primer3
	Primer3	Design d'amorces pour PCR.
	MFEprimer	Analyse de la spécificité d'amorces et prédiction de produits d'amplification potentiels.

**Figure 18. Démarche suivie pour la recherche de gènes spécifiques d'un phénotype. (A)** Principales étapes de l'analyse. **(B)** Présentation des outils informatiques nécessaires pour le traitement des données à chacune des étapes. \* Outils développés au laboratoire par Hugo Campbell-Sills. (D'après Campbell-Sills, 2012)



**Figure 19. Définition et composition du pan-génome.** (D'après Campbell-Sills, 2012)

peu informatif, le gène *recP* codant une transcétolase est hypervariable et parfois absent chez certaines souches (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier, 2011). Six gènes ont donc été séquencés par la méthode Sanger (Tableau 5). Une portion plus courte des séquences obtenues est utilisée de manière à comparer des séquences de qualité et de même taille. A l'aide du logiciel Bioedit, les séquences sont concaténées pour former une séquence de 3460pb. Un arbre phylogénétique est généré par la méthode Neighbor-Joining (NJ) associée au modèle de correction de Kimura 2 (Kimura, 1980), grâce au logiciel MEGA 4 (Tamura, 2007) ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)).

### 5.3. Assemblage, annotation et comparaison des génomes

Les 19 génomes d'*O. oeni* séquencés par la technologie 454 GS FLX Titanium (Roche) ont été assemblés par l'équipe de la plateforme bioinformatique de la Génopole de Toulouse à l'aide du logiciel Newbler (<http://bioinfo.genotoul.fr/>). Des génomes sous la forme de " draft " ont ainsi été générés. Puis, leur annotation a été effectuée au laboratoire à l'aide du logiciel RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, [rast.nmpdr.org/](http://rast.nmpdr.org/)) (Aziz *et al.*, 2008). Les trois génomes publics d'*O. oeni* PSU-1 (NC\_008528), ATCC BAA 1163 (AAUV000000000), AWRIB429 (ACSE000000000) ont été également annotés de cette façon pour faciliter les comparaisons génomiques. Pour toutes les analyses courantes des séquences génomiques (recherche de gènes, alignement), nous avons utilisé l'application Seed Viewer du logiciel RAST permettant une manipulation simple et rapide des données génomiques ([raqt.nmpdr.org/seedviewer](http://raqt.nmpdr.org/seedviewer)).

L'analyse de génomique comparative a été réalisée par Hugo Campbell-Sills lors de son stage de Master Recherche (Campbell-Sills, 2012). De nombreux outils bioinformatiques ont été développés pour permettre le traitement, l'adaptation, la vérification et le flux correct des données (Figure 18). Les comparaisons génomiques se sont basées sur la présence/absence de gènes et ont consisté à rechercher des gènes spécifiques d'un groupe phénotypique donné (" + " regroupant les meilleures souches et " - " regroupant les souches moins performantes). Pour cela, le pan-génome des souches à comparer est construit à l'aide de l'outil " pan-génome " basé sur la comparaison des annotations fournies par RAST (Figure 19). Les gènes appartenant au core-génome sont exclus de l'analyse car présents



chez l'ensemble des souches. Ce sont les gènes appartenant à leur éco-génome qui sont analysés. Parmi eux, seuls ceux toujours présents dans un groupe et toujours absents dans l'autre sont sélectionnés comme potentiel marqueur génétique d'un phénotype donné.

## 5.4. Analyses statistiques

### 5.4.1. Analyses classiques

Les analyses statistiques classiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica 7 (StatSoft France).

Le test de Shapiro-Wilk ou test de normalité permet de tester l'hypothèse selon laquelle une variable mesurée suit une distribution normale. Il est décisif pour définir si l'on s'oriente par la suite, vers des tests paramétriques adaptés aux données suivant une loi normale ou dans le cas contraire, vers des tests non paramétriques. Par définition, un test non paramétrique ne fait aucune hypothèse sur la distribution des données et attribue à chaque valeur observée, une valeur de rang qui sera utilisée lors des calculs statistiques. Les tests non paramétriques sont généralement utilisés lorsque le jeu de données ne répond pas aux critères des tests paramétriques. C'est le cas ici, les analyses statistiques présentées ci-dessous sont des tests non paramétriques.

Le coefficient de corrélation de Spearman ( $\rho$ ) indique le degré de liaison existant entre deux variables quantitatives de rang. Il est compris entre -1 et +1. Ces valeurs signifient une parfaite corrélation entre les deux variables, négative ou positive, respectivement. Au contraire, un coefficient de corrélation  $\rho$  de 0 traduit une absence totale de liaison. Pour évaluer le poids de la corrélation, la significativité du coefficient  $\rho$  est évaluée par un test bilatéral et une valeur de p-value lui est ainsi attribuée.

Le test de Mann Whitney est l'équivalent du test paramétrique t-student. C'est un test d'identité qui vise à démontrer que deux jeux de données (numériques ou ordinales) sont issus d'une même distribution. En d'autres termes, il permet d'évaluer si les moyennes de rang des deux jeux de données sont significativement différentes.

### Détermination de la sensibilité (Se)

$$Se = VP / VP + FN$$

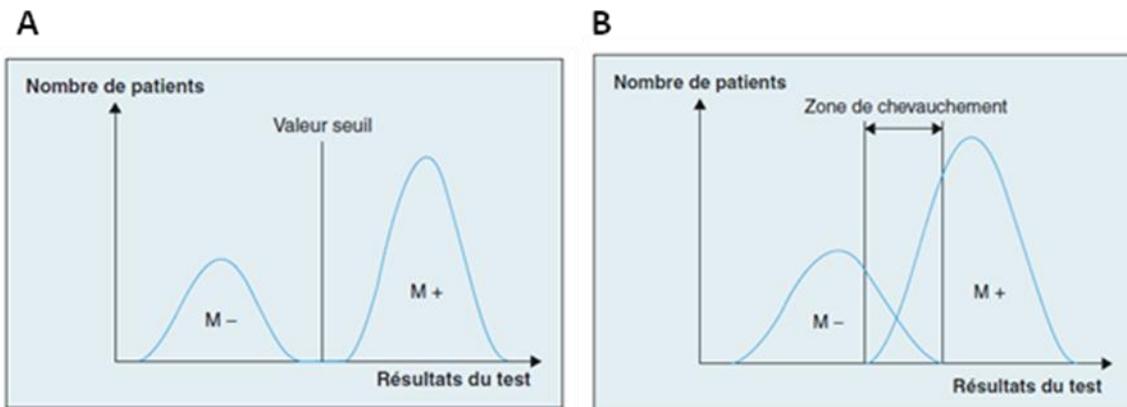
→ Proportion des vrais positifs chez les personnes malades

### Détermination de la spécificité (Sp)

$$Se = VN / VN + FP$$

→ Proportion des vrais négatifs chez les personnes non malades

**Figure 20. Détermination et signification de la sensibilité et de la spécificité, appliquées à un diagnostic clinique.** VP : vrais positifs, les résultats du diagnostic sont positifs chez les personnes malades, VN : vrais négatifs, les résultats sont négatifs chez les personnes non malades, FP : faux positifs, les résultats sont positifs chez les personnes non malades, FN : faux négatifs, les résultats sont négatifs chez les personnes malades.



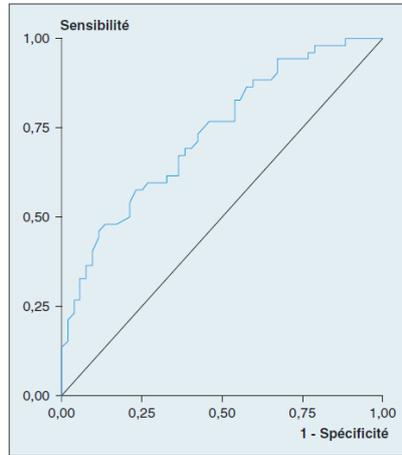
**Figure 21. Distribution des résultats d'un test clinique en fonction du caractère " malade " M+ et " non malade " M-.** (A) Cas d'un test parfait ( $Se = 1$  ;  $Sp = 1$ ) où la valeur seuil sépare distinctement les deux distributions M+/M-. (B) Cas d'un test biologique où il existe une zone de chevauchement entre les deux distributions. Cette zone correspond à la détection de FN et FP dont le nombre dépendra de la valeur seuil choisie pour le test. (D'après Delacour *et al.*, 2005)

### 5.4.2. Courbe ROC

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) est une mesure statistique de la performance d'un classificateur binaire. Cette méthode a été développée en 1950 à des fins militaires pour la détection des signaux radar. Son intérêt a ensuite été souligné en biomédical notamment dans le domaine pharmaceutique, en radiologie et en biologie pour évaluer la performance d'un diagnostic clinique.

La courbe ROC dépend des caractéristiques d'un test biologique que sont la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp). La sensibilité d'un test correspond à sa capacité à donner un résultat positif lorsque la condition est présente ; elle donne la proportion des vrais positifs. A l'opposé, la spécificité d'un test est évaluée par sa capacité à donner un résultat négatif lorsque la condition est absente ; elle correspond à la proportion des vrais négatifs (Figure 20). La sensibilité et la spécificité sont, elles-mêmes, influencées par la valeur seuil du test. Cette dernière permet de classer le résultat en négatif ou positif. Dans le cas d'un test parfait, la valeur seuil se situe entre les deux distributions et aucune erreur de classification ne sera donnée ( $Se = 1$  ;  $Sp = 1$ ). Ce n'est pas le cas pour les tests biologiques où il existe plutôt une zone de chevauchement plus ou moins grande entre les deux distributions conduisant à des erreurs de classification (Figure 21). La performance d'un classificateur va alors dépendre entièrement du choix de la valeur seuil qui est facilité par l'élaboration d'une courbe ROC.

La courbe ROC est une représentation graphique de la relation existante entre la sensibilité et la spécificité d'un test pour toutes les valeurs seuils possibles. Elle se représente comme un tracé en marches d'escaliers reliant entre elles chacune des valeurs seuils potentielles. L'axe des ordonnées correspond à la proportion de vrais positifs (Se) et l'abscisse représente les faux positifs ( $1 - Sp$ ) (Figure 22). Sa construction nécessite des logiciels de calcul spécialisé qui fournissent de nombreuses informations descriptives et statistiques facilitant l'interprétation de la courbe ROC obtenue. Le logiciel MedCalc 9.2.1.0 a été utilisé lors de ces travaux (Stephan *et al.*, 2003). La construction d'une courbe ROC nous a permis d'évaluer la capacité du facteur " présence/absence d'un gène donné " à expliquer la distribution d'une variable (propriétés technologiques) selon une valeur seuil de pertinence biologique. Dans notre cas, la courbe ROC est donc utilisée différemment ; non



**Figure 22. Représentation graphique d'une courbe ROC.** Pour chaque valeur seuil possible, la sensibilité et la spécificité du test sont calculées et positionnées sur le graphique formant une courbe en marche d'escaliers reliant le coin inférieur gauche (0,0) et le coin inférieur droit (1,1). La diagonale formée entre ces deux points représente un test d'intérêt nul. (D'après Delacour *et al.*, 2005)

pas pour évaluer la pertinence du test biologique pour donner un résultat positif/négatif avec un risque de se tromper minimum, mais pour déterminer si le résultat obtenu présence/absence du gène permet de classer les observations par rapport à la valeur seuil choisie, le plus justement possible.



## **RESULTATS ET DISCUSSION**



# **CHAPITRE 1**

**Recherche de gènes d'intérêt technologique**

**chez *O. oeni* : étude des plasmides.**

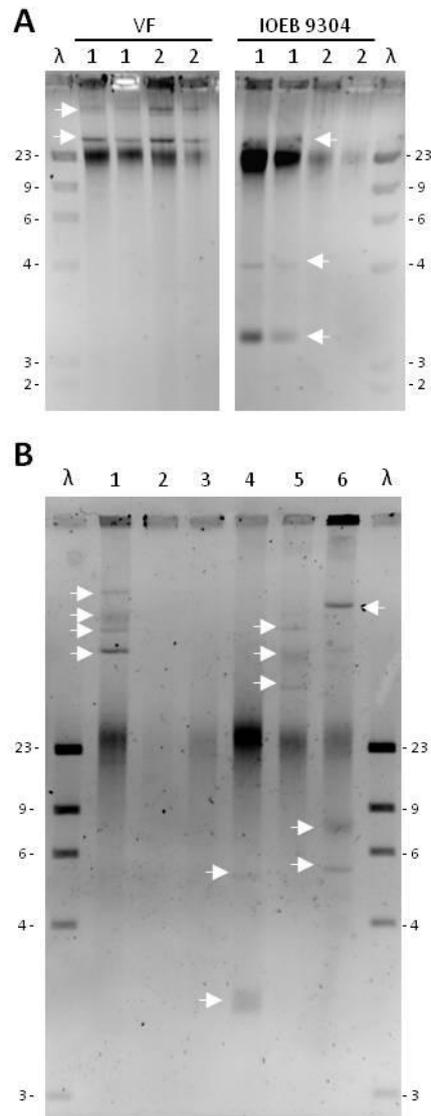


## 1. Essais de développement d'une méthode de purification des grands plasmides chez *O. oeni*

Les plasmides d'*O. oeni* sont encore méconnus. De nombreux auteurs ont estimé qu'ils étaient des éléments peu fréquents chez cette espèce (Orberg and Sandine, 1984 ; Cavin *et al.*, 1988 ; Fremaux *et al.*, 1993 ; Kelly *et al.*, 1993 ; Prevost *et al.*, 1995 ; Zavaleta *et al.*, 1997 ; Mesas *et al.*, 2011). Les difficultés reportées pour extraire ces plasmides à partir de la méthode classique de purification par lyse alcaline pourraient être à l'origine d'une sous-évaluation de leur nombre (Anderson and Mc Kay, 1983). En effet, diverses tentatives d'extraction à partir de petits volumes de culture cellulaire n'ont pas permis de détecter des plasmides chez des souches d'*O. oeni*, alors qu'une purification à plus grande échelle, réalisée sur trois litres de culture, a révélé la présence de petits et grands plasmides chez 75% des souches testées (Brito and Paveia, 1999). Au cours de ses travaux, Eric Bihère s'est également confronté à ces difficultés. Il a obtenu de très faibles rendements d'extraction avec *O. oeni*, en comparaison de ceux obtenus avec des lactobacilles. Ce problème de purification concerne particulièrement les grands plasmides et il est récurrent chez de nombreuses autres espèces (Anderson and McKay, 1983 ; Barton *et al.*, 1995). Le faible nombre de copies par cellule des grands plasmides, associé à une lyse cellulaire inefficace et à des conditions de migration électrophorétique inadaptées, sont souvent à l'origine de l'absence de détection de ces éléments.

Le premier objectif de cette étude était d'isoler, séquencer et identifier des plasmides d'*O. oeni* afin d'évaluer leur contribution dans la diversité phénotypique de l'espèce. Pour cela, nous avons besoin de mettre au point une technique de purification des grands plasmides, éléments susceptibles de porter des gènes accessoires d'intérêt technologique. Nous avons testé et tenté d'optimiser deux approches : l'extraction sur plug d'agarose suivie d'une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et la purification classique par lyse alcaline (Anderson and Mc Kay, 1983 ; Barton *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 2007).

L'extraction par utilisation de plug d'agarose associée à une électrophorèse en champs pulsé permet la purification et la mise en évidence de fragments d'ADN de grande taille. Elle est couramment utilisée pour l'analyse de fragments d'ADN chromosomique, mais



**Figure 23. Essais de purification des plasmides d'*O. oeni* par lyse alcaline suivie d'une électrophorèse en champs pulsé.** (A) Premier essai de migration (22h, 14°C, 1,5 V/cm, temps de pulse 3 à 50s). 1, Cultures obtenues à partir de cellules conservées à -80°C ; 2, Cultures issues d'un repiquage. (B) Optimisation de la migration (20h, 14°C, 3 V/cm, temps de pulse 3 à 50s). 1 à 4, souches d'*O. oeni* (VF, IOEB 0608, S11, IOEB 9304) ; 5, *Lactobacillus brevis* ; 6, *Lactobacillus salivarius*. Les flèches blanches montrent les plasmides probablement sous différentes conformations.  $\lambda$  : marqueur de poids moléculaire (kpb).

elle peut être adaptée aux grands plasmides linéarisés par un traitement à la nucléase S1. Il est d'ailleurs, parfois suggéré la présence de plasmides dans les profils génétiques NotI-PFGE de certaines souches (voir Figure 30). Nous avons donc utilisé cette méthode et tenté de l'optimiser en faisant varier les quantités de cellules traitées (de 1X,  $5 \times 10^8$  cellules/plug à 10X,  $5 \times 10^9$  cellules/plug), les conditions de lyse cellulaire (tampon de lyse, lysozyme, mutanolysine) et les conditions de linéarisation à la nucléase S1 (1 à 10 unités, température et durée d'incubation). Les essais ont été réalisés avec la souche *O. oeni* VF qui possède le plasmide pEB03 de 18 kpb (Bilhère, 2009). Malheureusement, aucune des tentatives n'a permis d'isoler ce plasmide après électrophorèse en champ pulsé.

Le protocole d'extraction par lyse alcaline d'Anderson et Mc Kay (1983) associée à une électrophorèse classique a également été testé, en adaptant les concentrations cellulaires et les réactifs. Les conditions utilisées ont permis de détecter les petits plasmides, mais pas les plus grands. Suite à ces échecs, nous avons testé un nouveau protocole développé pour l'extraction des plasmides chez *Lactobacillus sakei* (S. Chaillou, communication personnelle) que nous avons associé à la technique PFGE. L'extraction a été réalisée à partir de 10 ml de culture divisés en 5 lots de 2 ml. Chaque lot a été traité par lyse alcaline, puis les ADN extraits ont été rassemblés, coulés dans de l'agarose et séparés en champ pulsé. Cette approche a permis de détecter les premiers grands plasmides d'*O. oeni* pour la première fois (Figure 23A). Les conditions de migration ont ensuite été adaptées pour améliorer leur séparation. Cette approche a bien permis de détecter des plasmides chez les souches VF et IOEB 9304, mais pas chez deux autres souches dont nous savons qu'elles possèdent des plasmides : *O. oeni* IOEB 0608 et S11 (Figure 23B). Par conséquent, bien qu'elle soit intéressante pour certaines souches, nous n'avons pas pu l'employer pour réaliser un inventaire des plasmides chez les souches d'*O. oeni*.

En raison de ces échecs à purifier les plasmides d'*O. oeni* et de la mise en place d'une stratégie de séquençage des génomes d'*O. oeni* au laboratoire, nous avons décidé de poursuivre la recherche de gènes d'intérêt technologique d'*O. oeni* par l'analyse des génomes (Résultats et discussion, Chapitre 2). Néanmoins, nous avons également souhaité poursuivre la caractérisation du seul " grand " plasmide qui avait été identifié jusque là au laboratoire : le plasmide pEB03 identifié et séquencé par Eric Bilhère au cours de sa thèse (Bilhère, 2009).

**Tableau 7. Mise à jour de l'annotation de pOENI-1.**

ORF	Position	%GC	Protéine	Taille (aa)	Fonction prédite	Meilleurs résultats obtenus par BlastP (numéro d'accésion GenBank)	% identité
1	108-1619	44,0	Tral	503	Topoisomérase	<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554659)	96
						<i>Lactobacillus pentosus</i> , DNA topoisomerase (CCB84017)	95
						Plasmid pPECL-8, <i>Pediococcus clausenii</i> , DNA topoisomerase (YP_005353127)	94
2	1742-1957	38,9	HP	71	Hypothétique	<i>Lactobacillus brevis subsp gravesensis</i> , hypothetical protein (ZP_03940833)	90
						<i>Lactobacillus parafarraginis</i> , hypothetical protein (ZP_09393039)	90
						<i>Lactobacillus pentosus</i> , uncharacterized protein (CCC15439)	89
3	1961-3082	42,7	LtrC	373	Protéine LtrC	<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554657)	97
						Plasmid pH10, <i>Lactobacillus helveticus</i> , LtrC-like protein (YP_005851193)	96
						<i>Lactobacillus coryniformis subsp torquens</i> , putative LtrC protein (ZP_08575182)	93
4 <sup>ψ</sup>	3096-4054	36,1	Gdh	144	Glycérate déshydrogénase	<i>Lactobacillus coryniformis subsp torquens</i> , glycerate dehydrogenase (YP_08574883)	99
						Plasmid pH10, <i>Lactobacillus helveticus</i> , serA gene product (ZP_005851192)	99
						<i>Lactobacillus coryniformis subsp coryniformis</i> , glycerate dehydrogenase (EJO04655)	99
5	4558-4172	42,1	HP	128	Hypothétique	<i>Lactobacillus mali</i> , hypothetical protein (ZP_09449467)	95
						<i>Lactobacillus paracasei subsp paracasei</i> , hypothetical protein (ZP_03963367)	95
						Plasmid pPECL-8, <i>Pediococcus clausenii</i> , hypothetical protein (YP_005353120)	94
6	4871-4551	40,5	HP	106	Hypothétique	<i>Lactobacillus brevis subsp gravesensis</i> , hypothetical protein (ZP_03940921)	99
						Plasmid pPECL-8, <i>Pediococcus clausenii</i> , hypothetical protein (YP_005353119)	98
						<i>Lactobacillus paracasei subsp paracasei</i> , hypothetical protein (ZP_03963368)	98
7	5865-5281	52,7	TetR	194	Régulateur transcriptionnel	<i>Lactobacillus mali</i> , TetR family transcriptional regulator (ZP_09449471)	99
						<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554653)	99
						Phage fOg44, <i>Oenococcus</i> , transcriptional regulator (AAD10709)	44
8	6041-6787	53,3	TauE	248	Perméase	<i>Lactobacillus mali</i> , permease (ZP_09449472)	99
						<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554652)	98
						Phage fOg44, <i>Oenococcus</i> , putative permease (AAD10707)	55
9	7365-7952	41,8	Res	195	Résolvase	<i>Lactobacillus crispatus</i> , resolvase (YP_003601011)	99
						<i>Lactobacillus zeae</i> , resolvase (ZP_09454742)	98
						<i>Lactobacillus helveticus</i> , resolvase family site specific recombinase (ZP_05753511)	98
10	9124-8192	35,3	LysR	310	Régulateur transcriptionnel	<i>Oenococcus oeni</i> , transcriptional regulator LysR family (ZP_01543901)	100
						<i>Lactobacillus parafarraginis</i> , LysR substrate binding domain protein (ZP_09392088)	31
						<i>Lactobacillus buchneri</i> , transcription regulator (ZP_03941663)	31
11	9267-10448	42,1	Oye	393	Flavine oxydoréductase NADH dépendante	<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554726)	99
						<i>Oenococcus oeni</i> , NADH-dependent flavin oxidoreductase (ZP_01543900)	100
						<i>Lactobacillus versmoldensis</i> , NADH: flavin oxidoreductase (ZP_09443753)	71
12	11258-10575	45,5	Tnp	227	Transposase	<i>Oenococcus oeni</i> , transposase (ZP_01543898)	100
						Plasmid 1, <i>Lactobacillus casei</i> , transposase (YP_796441)	99
						Plasmid pCD01, <i>Lactobacillus paracasei subsp paracasei</i> , transposase (YP_003329280)	99
13	11927-11649	41,6	ParB	92	Protéine de partition	Plasmid 1, <i>Lactobacillus casei</i> , PrgO-like protein (YP_796449)	100
						Plasmid pRE25, <i>Enterococcus faecalis</i> , putative PrgO protein (YP_783940)	44
						<i>Enterococcus faecalis</i> , PrgO protein (ZP_04436015)	42
14	12831-11908	40,8	ParA	307	Protéine de partition	Plasmid 1, <i>Lactobacillus casei</i> , chromosome partitioning ATPase (YP_796448)	100
						<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554744)	99
						Plasmid pLG2, <i>Enterococcus faecalis</i> , PrgP protein (AEF32544)	61
15	13334-14449	39,5	RepA	371	Protéine de réplication	<i>Lactobacillus suebicus</i> , replication initiator A domain protein (ZP_094519)	77
						Plasmide pPECL-6, <i>Pediococcus clausenii</i> , recA gene product (YP_005353077)	76
						<i>Lactobacillus coryniformis subsp torquens</i> , replication initiator protein (ZP_08575213)	74
16	14709-14990	42,9	RelB	93	Antitoxine	<i>Lactobacillus hilgardii</i> , DNA-damage-inducible protein (ZP_03954201)	100
						<i>Lactobacillus helveticus</i> , putative RelB-like protein (YP_005850843)	99
						Plasmid pWCFS103, <i>Lactobacillus plantarum</i> , DNA-damage-inducible gene (YP_133715)	99
17	14980-15486	35,9	PemK	168	Toxine	<i>Lactobacillus paracasei subsp paracasei</i> , hypothetical protein (ABA12818)	99
						<i>Oenococcus oeni</i> , hypothetical protein (ZP_06554663)	99
						<i>Lactobacillus hilgardii</i> , conserved hypothetical protein (ZP_03954202)	99
18	15754-15476	34,8	HP	92	Hypothétique	<i>Lactobacillus coryniformis subsp coryniformis</i> , hypothetical protein (EJN53245)	98
						Plasmid pPECL-8, <i>Pediococcus clausenii</i> , hypothetical protein (YP_005353130)	97
						Plasmid 2, <i>Lactobacillus brevis</i> , hypothetical protein (YP_796419)	97
19	15985-15776	30,0	HP	69	Hypothétique	<i>Lactobacillus coryniformis subsp coryniformis</i> , hypothetical protein (EJN53246)	99
						Plasmid pPECL-8, <i>Pediococcus clausenii</i> , hypothetical protein (YP_005353129)	99
						<i>Lactobacillus pentosus</i> , uncharacterized protein (CCC15329)	90
20 <sup>ψ</sup>	16256-18320	39,5	TraA	391	Nickase	<i>Lactobacillus pentosus</i> , nickase (CCC15328)	92
						<i>Lactobacillus coryniformis subsp coryniformis</i> , nickase (EJN53247)	91
						<i>Lactobacillus mali</i> , nicking enzyme TraA protein (ZP_09449513)	91

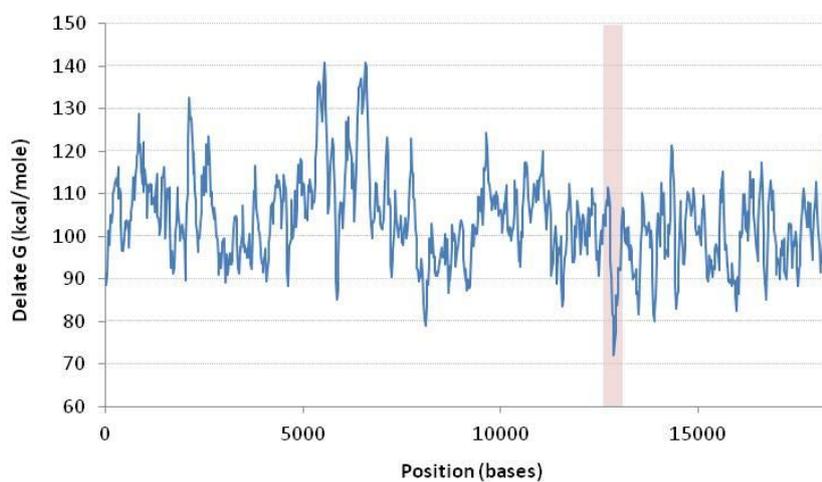
ψ, pseudogène ; aa, acide aminé ; caractère gras, pourcentage d'identité ne couvrant pas la totalité de la protéine.

## 2. Analyse du plasmide pOENI-1

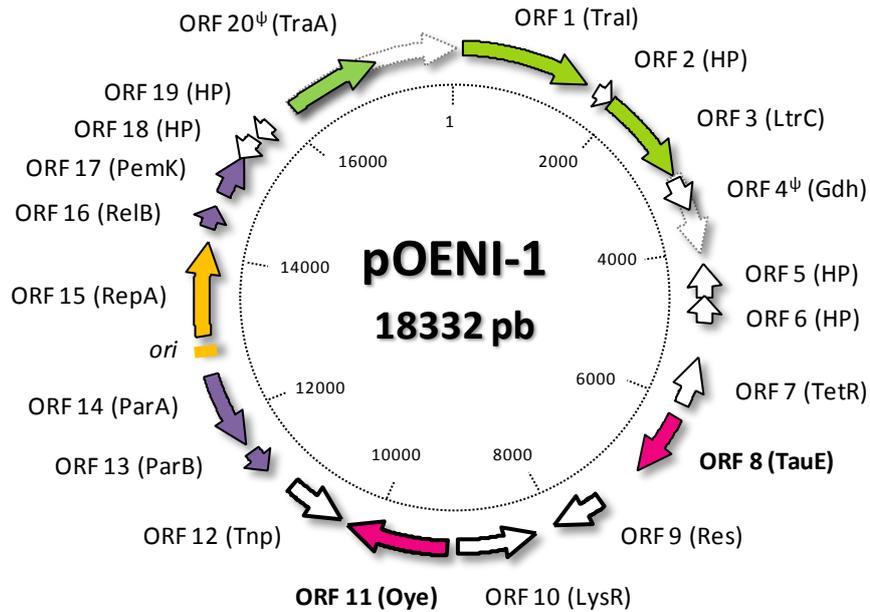
### 2.1. Rappels du contexte de ces travaux

Au cours de sa thèse, Eric Bihère avait isolé et séquencé le plasmide pEB03 de la souche commerciale *O. oeni* VF (Bihère, 2009). Il l'avait décrit comme étant un plasmide circulaire, de 18322 pb et contenant 20 ORFs putatives, dont deux étaient vraisemblablement interrompues précocement par un codon stop (ORFs 4 et 20). Les 18 autres semblaient coder pour des protéines complètes et fonctionnelles. Eric Bihère avait prédit une fonction protéique pour 14 des 20 ORFs identifiées. L'analyse de sa séquence suggérait que pEB03 était un plasmide utilisant un mécanisme de réplication de type thêta, qu'il était non conjugatif et qu'il codait pour des protéines de partition probablement impliquées dans la distribution de ses différentes copies au cours de la division cellulaire. Il s'était particulièrement intéressé à l'ORF 11 qui code pour une flavine oxydoréductase NADH dépendante de la famille des " Old Yellow Enzyme " (OYE). Le rôle biologique des enzymes OYE est encore méconnu chez les bactéries lactiques, mais elles pourraient contribuer à la réponse au stress et en particulier au stress oxydatif. De façon remarquable, ce plasmide avait été isolé d'un levain malolactique, ce qui suggérait qu'il pourrait conférer un avantage adaptatif à son hôte. Cependant, aucun rôle physiologique n'avait pu être démontré (Introduction, paragraphe 2.1.4).

Compte tenu des difficultés rencontrées pour isoler de nouveaux plasmides d'*O. oeni*, et compte tenu de l'intérêt technologique potentiel de pEB03, nous avons choisi de poursuivre l'analyse du plasmide. Dans toute la suite des travaux, nous avons renommé ce plasmide pOENI-1 pour apporter une précision quant à l'espèce hôte *O. oeni*. Les bases de données internationales évoluant rapidement, l'analyse de la séquence du plasmide pOENI-1 a été mise à jour (Tableau 7 et Figure 24). Des fonctions protéiques ont pu être proposées pour l'ORF 17, ou précisées pour les ORF 8, 15 et 16, en recherchant des séquences similaires (Blastp) et des signatures protéiques (InterProScan et COGnitor).



**Figure 25. Profil de la stabilité thermodynamique de la séquence pOENI-1.** L'encadré rose indique une zone d'instabilité thermodynamique localisée en amont du gène *repA* aux positions 12832-12915.



**Figure 24. Carte génétique de pOENI-1 mise à jour.** Parmi les 20 ORFs identifiées, une fonction protéique a été prédite pour 15 d'entre elles. Les couleurs représentent le réplicon de pOENI-1 (jaune), les ORFs impliquées dans les mécanismes de conjugaison (vert) et de maintenance (violet), les gènes d'intérêt potentiel ayant une fonction assignée (rose), les régulateurs de transcription associés aux ORFs d'intérêt, la glycérate déshydrogénase tronquée et les protéines hypothétiques (blanc). Les flèches au contour épais correspondent aux 4 ORFs détectées également sur le chromosome de la souche ATCC BAA 1163. Les deux pseudogènes sont représentés par le symbole  $\psi$  et la taille initiale de l'ORF est symbolisée par une flèche en arrière plan.

## 2.2. Analyse de l'origine de réplication et de la protéine RepA

Le réplicon, composé de la protéine RepA et de son origine de réplication (*ori*), semble spécifique à pOENI-1. En amont du gène *repA*, Eric Bilhère avait identifié une séquence *ori* riche en bases AT et contenant des itérons. Quelques modifications et précisions concernant la taille et la composition de cette séquence ont été apportées au cours de ce travail. Le profil de stabilité thermodynamique de la séquence pOENI-1 nous a permis de détecter les régions riches en bases AT (Webthermodyn) (Figure 25). Celles-ci présentent une instabilité thermodynamique caractérisée par une énergie libre ( $\Delta G$ ) beaucoup plus faible que les séquences environnantes (Rajewska *et al.*, 2011). Une région contenant 71 % de bases AT a été identifiée en amont du gène *repA* aux positions 12832-12915 (Figure 25). L'analyse de la séquence intergénique entre *parA* (ORF 14) et *repA* (ORF 15) a révélé la présence d'itérons de 18pb répétés 7 fois de manière imparfaite

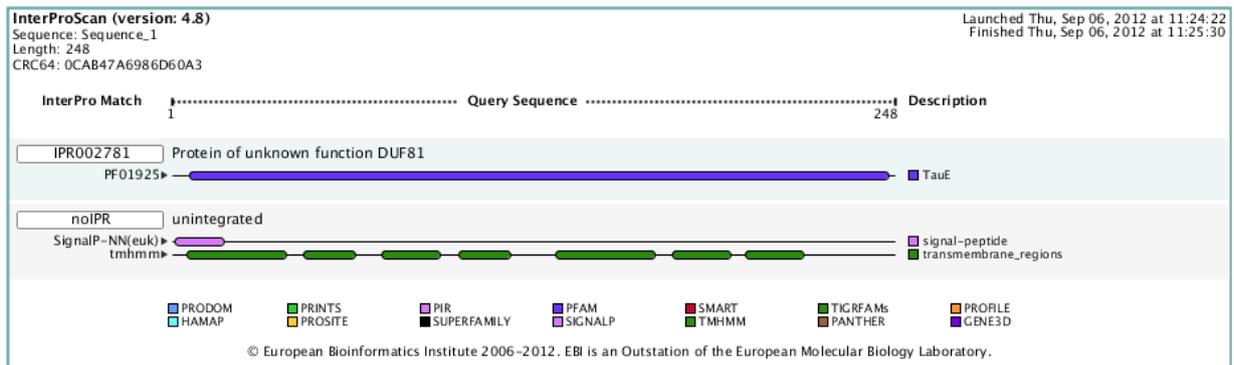


(atatatctgatataca, positions 12862-12987). La séquence *ori* de pOENI-1 correspond donc à une région de 157 nucléotides contenant les principales caractéristiques d'une origine de réplication de type thêta. Seul le plasmide p1 de *Lactobacillus casei* contient une origine de réplication identique à pOENI-1. La protéine RepA partage plus de 70% de similarité de séquence avec les protéines de réplication caractérisées et identifiées chez des plasmides de type thêta, comme plca36 de *Lactobacillus casei* Zhang (Zhang *et al.*, 2008), pLgLA39 de *Lactobacillus gasseri* LA39 (Ito *et al.*, 2009) et pSF118-44 de *Lactobacillus salivarius* UCC118 (Fang *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations suggère la présence d'un réplicon (*ori* + *repA*) de type thêta spécifique à pOENI-1.

### 2.3. Identification d'un module d'addiction toxine-antitoxine

Chez pOENI-1, Eric Bilhère avait identifié un système de partition composé des ORFs 13 et 14 qui codent des protéines ParB et ParA, respectivement (Bilhère, 2009). Il avait suggéré que ce système pourrait participer à la ségrégation uniforme des copies plasmidiques lors de la scission bactérienne. L'ORF 16 avait été annotée comme codant une protéine induite lors de dommages à l'ADN, et l'ORF 17, une protéine hypothétique. Les nouvelles analyses par Blast et la recherche de domaines protéiques par InterProScan nous ont permis de proposer l'existence d'un second système impliqué dans la maintenance du plasmide, système constitué d'un module d'addiction de type toxine-antitoxine (Tableau 7). En effet, la protéine codée par l'ORF 16 a été classée comme appartenant à la famille des antitoxines RelB (pfam04221) et l'ORF 17 semble codée une toxine de type PemK (pfam02452).

Dans ces systèmes, les gènes sont généralement organisés en opéron avec le gène de l'antitoxine en amont, comme chez pOENI-1 (Figure 24). En condition de stabilité, l'antitoxine labile et la toxine stable forment un complexe responsable de l'auto-répression transcriptionnelle de l'opéron, inhibant ainsi la synthèse et l'activité de la toxine. Lors de la division cellulaire, la cellule fille n'ayant pas de copies plasmidiques voit une rapide dégradation de l'antitoxine et une libération des toxines. Elles agissent par inhibition de la transcription et de la traduction, ce qui conduit à la mort de la cellule fille dépourvue de plasmide et assure la stabilité plasmidique au cours de la multiplication bactérienne (Gerdes



**Figure 26. Identification et visualisation des domaines protéiques codés par l'ORF 8.** Il est ici représenté les résultats d'une analyse de la séquence protéique par Interproscan. La détection d'une région TauE (bleu) couvrant la quasi-totalité de la protéine nous a permis de classer l'ORF 8 dans la famille pfam 01925 définie comme " Sulfite exporter TauE/SafE ". Un peptide signal (rose) et sept domaines transmembranaires (vert) ont également été reconnus et signe une protéine de type membranaire.

*et al.*, 1986 ; Yamaguchi *et al.*, 2011). Cependant, aucun système toxine-antitoxine composé de ces deux gènes *relB* et *pemK* n'a été mis en évidence dans la littérature (Gotfredsen *et al.*, 1998 ; Fang *et al.*, 2008 ; Ito *et al.*, 2009). Ils sont plutôt associés respectivement aux gènes *relE* codant une toxine et *pemI* codant une antitoxine. Il s'agit donc probablement d'un nouveau système toxine-antitoxine qui n'a jamais été décrit jusqu'à présent. L'étude du rôle de ces deux gènes dans la maintenance des plasmides permettrait de confirmer s'ils sont associés sur le plasmide pOENI-1 en un système toxine-antitoxine fonctionnel.

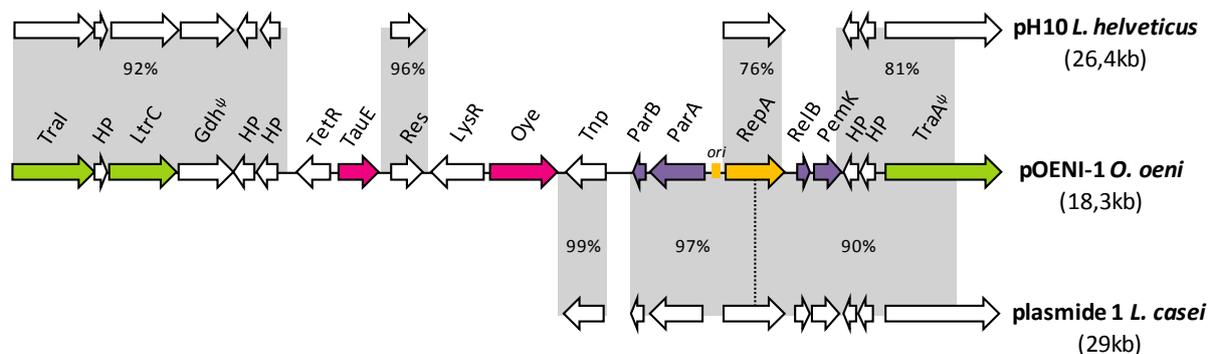
## 2.4. Identification d'une perméase de la famille TauE

La précédente annotation de pOENI-1 avait révélé une seule ORF dont la fonction prédite pourrait conférer un avantage sélectif aux bactéries : l'ORF 11, qui code pour une enzyme de la famille OYE. Cette annotation n'avait cependant pas permis d'assigner des fonctions à plusieurs ORFs codant des protéines " hypothétiques ". Les nouvelles analyses ont montré que les séquences similaires à l'ORF 8 sont annotées pour la plupart comme " protéine hypothétique " ou " perméase putative " appartenant à la famille COG0730 codant la fonction générale de perméase (Tableau 7). En accord avec ces observations, la séquence protéique codée par l'ORF 8 contient un peptide signal en position N-terminal et sept domaines transmembranaires, suggérant qu'il s'agit bien d'une protéine membranaire (Figure 26). La protéine prédite contient également la signature spécifique des enzymes de la famille TauE (pfam01925, Sulfite exporter TauE/SafE). Ces protéines sont définies comme des transporteurs anioniques impliqués dans l'export de sulfites libres ou combinés au cours du métabolisme de la taurine chez certaines bactéries à Gram négatif (Weinitschke *et al.*, 2007 ; Krejčík *et al.*, 2008).

Les séquences les plus proches de celle codée par l'ORF 8 ont été identifiées chez les phages d'*O. oeni* fOgPSU1, fOg30 et fOg44 (Parreira *et al.*, 1999) et chez d'autres bactéries lactiques comme *Lactobacillus mali* (Carr and Davies, 1970), *Lactobacillus hilgardii* (Lucas *et al.*, 2005), *Lactobacillus malefermentans* (Russel *et al.*, 1953), *Lactobacillus parafarraginis* (Endo *et al.*, 2007) ou *Pediococcus claussenii* (Pittet *et al.*, 2012) ; toutes isolées de produits fermentés et notamment de boissons alcoolisées. L'environnement génétique du gène *tauE* est variable chez ces espèces ; nous avons vu d'après l'analyse des séquences génomiques

**Tableau 8. Plasmides de bactéries lactiques similaires à pOENI-1.**

Plasmide	Espèce	Taille (kpb)	Couverture (%)	Identité nucléotidique (%)
pH10	<i>L. helveticus</i>	26,4	47	90
pST-III	<i>L. plantarum</i>	53,5	45	89
pLgLA39	<i>L. gasseri</i>	33,3	43	89
plca36	<i>L. casei</i>	36,4	43	89
pPECL-8	<i>P. clausenii</i>	33,2	42	90
pPECL-5	<i>P. clausenii</i>	36,8	42	91
pWW2	<i>L. kefiranofaciens</i>	46,2	40	91
p1	<i>L. casei</i>	29	38	93
pLTK13	<i>L. plantarum</i>	34,5	33	90
pLBUC01	<i>L. buchneri</i>	31,5	32	87



**Figure 27. Alignements des séquences similaires entre pOENI-1 et deux plasmides de bactéries lactiques.** Le plasmide pH10 de *Lactobacillus helveticus* présente la plus large couverture de séquence (47%) avec pOENI-1. Le plasmide p1 de *Lactobacillus casei* est le seul à présenter une origine de réplication identique à celle de pOENI-1.

qu'il peut être associé à divers transporteurs, à des ARN de transfert ou à des transposases. Sur le plasmide pOENI-1, l'ORF 8 est localisée à proximité d'un régulateur de transcription de la famille TetR (ORF 7) (Figure 24). Ce type de régulateur est souvent impliqué dans le contrôle transcriptionnel des pompes à efflux de type " multidrug resistance protein ", des mécanismes de détoxification et de pathogénicité, et de la biosynthèse des antibiotiques (Ramos *et al.*, 2005). Le gène d'un régulateur de transcription de type TetR est également présent à proximité des gènes *tauE* chez *L. mali* et les phages fOgPSU1, fOg30 et fOg44 d'*O. oeni* (Tableau 7). Les pourcentages en bases GC des gènes *tetR* et *tauE* de pOENI-1 sont respectivement de 52,7 et 53,3%, ce qui est nettement supérieur à ceux du plasmide et du génome d'*O. oeni*, qui sont de 40,8% et 38%, respectivement. Cette différence suggère qu'ils ont été acquis par transfert horizontal. Par comparaison, les gènes *tauE* et *tetR* portés par les phages d'*O. oeni* contiennent respectivement 33% et 34% de bases GC. Chez *L. mali*, les pourcentages en bases GC des gènes *tetR* (52%) et *tauE* (54%) sont nettement supérieurs à celui du génome, qui est de 36%, et similaires à ceux du plasmide pOENI-1, suggérant une origine génétique probablement commune.

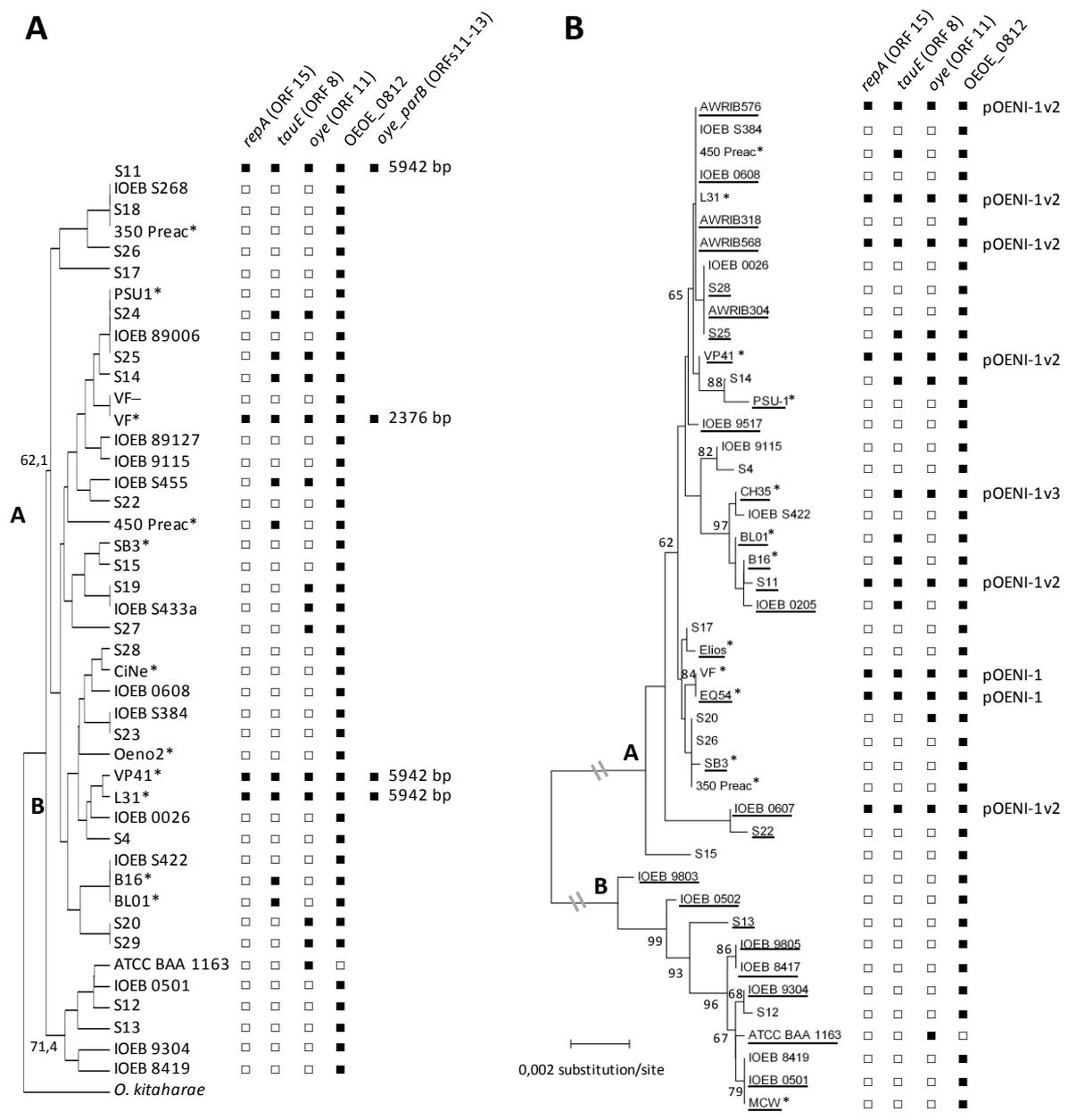
Dans l'éventualité où l'ORF 8 de pOENI-1 coderait pour un exporteur de sulfites, elle pourrait permettre aux souches qui la possèdent de résister à cet antiseptique présent dans le vin suite à son ajout par le vinificateur ou à sa production par les levures. L'ORF 8 apparaît donc comme une seconde ORF du plasmide qui pourrait avoir un intérêt pour la bactérie.

## 2.5. Comparaison avec les plasmides de bactéries lactiques

Des recherches dans les bases de données publiques (Blastn) ont montré que plusieurs plasmides de bactéries lactiques présentent d'importantes similarités de séquences avec pOENI-1 (Tableau 8). Néanmoins, aucun n'est similaire sur la totalité de la séquence. Les 10 plasmides les plus proches partagent des régions couvrant de 32 à 47% de pOENI-1. Les régions concernées contiennent les ORFs codant des protéines impliquées dans les mécanismes de réplication, maintenance et conjugaison ou des protéines hypothétiques. La Figure 27 montre par exemple les régions conservées entre pOENI-1 et les plasmides pH10 de *Lactobacillus helveticus* et p1 de *Lactobacillus casei*. Seules les ORFs 8 et 11 codant les protéines TauE et Oye ainsi que les deux régulateurs de transcription à proximité (ORFs 7



et 10) n'ont été détectées chez aucun plasmide. Les 10 plasmides présentés dans le Tableau 8, portent tous des gènes codant diverses fonctions accessoires impliquées, par exemple, dans la résistance aux antibiotiques ou aux bactériophages, dans le transport d'acides aminés ou dans la synthèse d'exopolysaccharides. Malgré sa petite taille (18 kpb), pOENI-1, comme les autres plasmides, est aussi susceptible de conférer certaines propriétés à la souche hôte, par l'intermédiaire des protéines TauE et Oye, mais aussi des cinq protéines hypothétiques.



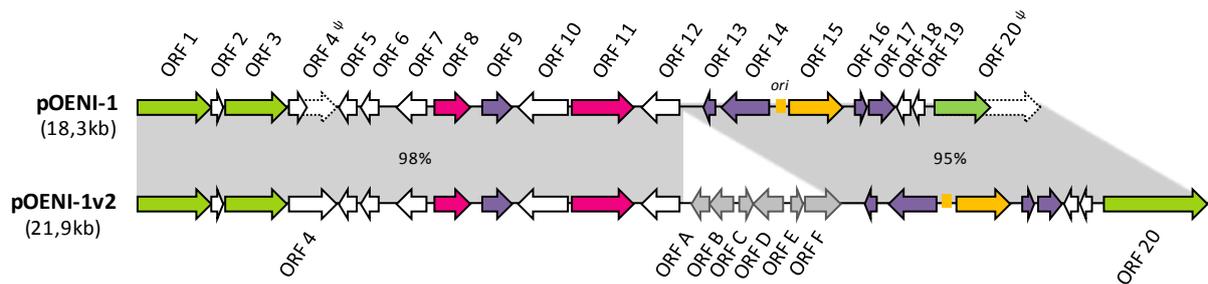
**Figure 28. Distribution des plasmides de type pOENI-1 parmi 59 souches d'*O. oeni*.** (A) Le dendrogramme UPGMA a été construit à partir des profils NotI-PFGE des 44 souches d'*O. oeni* et d'une souche d'*Oenococcus kitaharae* utilisée pour enraciner l'arbre. La souche S11 sans profil NotI-PFGE a été positionnée dans le groupe A sur la base d'une analyse MLST (ci-contre). La taille d'une région variable comprise entre les ORFs 11 (*oye*) et 13 (*parB*) indique la présence de pOENI-1 (2376pb) et pOENI-1v2 (5942pb). (B) L'arbre phylogénétique basé sur une analyse MLST des génomes disponibles et de quelques souches préalablement typées a été réalisé par la méthode neighbor-joining (NJ). Les sous-populations génétiques A et B décrites chez l'espèce *O. oeni* sont indiquées. Les pourcentages de similarités et les valeurs de bootstrap (>60) sont également indiqués dans les arbres UPGMA et MLST, respectivement. Carré noir, présence du gène ; carré blanc, absence du gène ; astérisque, levain malolactique ; souligné, séquence génomique disponible.

### 3. Analyse de la distribution du plasmide pOENI-1 chez *O. oeni*

#### 3.1. Détection du plasmide par PCR dans une collection de 44 souches

La fréquence du plasmide pOENI-1 a été évaluée au sein d'une collection de 44 souches d'*O. oeni* incluant 11 levains malolactiques, 15 souches de la collection du laboratoire collectées entre 1983 et 2009, et 18 souches que nous avons isolées à partir de divers vins en cours de FML lors des campagnes de vinification 2008 et 2009. Un dendrogramme basé sur le profil de restriction NotI-PFGE des 44 souches a été construit afin de les discriminer et de les positionner les unes par rapport aux autres (Figure 28A). Le plasmide pOENI-1 a été recherché par PCR en ciblant trois gènes : *repA* (ORF 15, repA1-repA2), qui est spécifique du réplicon de type pOENI-1, et les deux gènes d'intérêt potentiel *tauE* (ORF 8, 8a-8b) et *oye* (ORF 11, oye1-oye2). Chaque fois que les 3 gènes ont été détectés chez une souche, des PCR supplémentaires ont été réalisées en utilisant trois couples d'amorces qui permettent d'amplifier la totalité du plasmide dans 3 " grands " fragments de 6,4kpb (2repA-NC1), 9,8kpb (orf20a\_orf10) et 5,2kpb (repA2-NC3). Par ailleurs, comme il a été constaté que le gène *oye* est localisé sur le chromosome de la souche *O. oeni* ATCC BAA 1163 dans un locus comprenant 10 gènes, lui-même intégré dans le gène chromosomique OEOE\_0812 (Introduction, Figure 9), une autre PCR (0812a\_0812b) a été réalisée sur l'ensemble des souches pour vérifier l'intégrité de ce gène et déterminer s'il contient ou non le locus incluant le gène *oye*.

Parmi les 44 souches d'*O. oeni*, les trois ORFs du plasmide ont été détectées chez seulement quatre d'entre elles, incluant trois levains malolactiques (L31, VF et VP41) et un nouvel isolat (S11) (Figure 28A). La forme circulaire du plasmide a été confirmée par la série de trois PCR couvrant la totalité de la séquence. Au cours de cette vérification, une région de taille variable a été mise en évidence entre les ORFs 11 et 15. Une quatrième PCR a permis de confirmer et préciser la taille de cette séquence, qui se situe finalement entre les ORFs 11 et 13. Un fragment de 2376pb a été amplifié sur le plasmide pOENI-1 de la souche VF, alors qu'un amplicon de 5942pb a été obtenu pour les trois autres (S11, L31 et VP41), suggérant la présence d'un plasmide de type pOENI-1, mais de plus grande taille, que l'on a désigné pOENI-1v2.



**Figure 29. Alignement des séquences de pOENI-1 et de la forme variante pOENI-1v2.** Le plasmide pOENI-1v2 se présente sous la forme d'une molécule d'ADN circulaire de 21926pb codant 26 ORFs. Sa séquence couvre la totalité de la séquence de pOENI-1 et contient une région additionnelle de 3567pb. Les six nouvelles ORFs identifiées codent une recombinase de 216aa (ORF D), trois transposases de 127aa (ORF A), 83aa (ORF E), 258aa (ORF F) et deux protéines hypothétiques de 147aa (ORF B) et 94aa (ORF C). Les ORFs 4 et 20 tronquées ( $\psi$ ) chez pOENI-1 sont complètes chez pOENI-1v2. Numéro d'accèsion Genbank : pOENI-1, JX416328 ; pOENI-1v2, JX416329.

La proximité phylogénétique des souches L31 et VP41 suggère une transmission verticale du plasmide, alors qu'une acquisition par transfert horizontal est supposée pour les souches VF et S11. D'après une analyse MLST, la souche S11, pour laquelle le profil NotI-PFGE n'a pas pu être obtenu, est proche des souches B16, BL01 et IOEB S422 (Figure 28B). La recherche des gènes du plasmide pOENI-1 par PCR n'a pas révélé de souches supplémentaires contenant une séquence complète du plasmide, le gène *repA* n'étant présent que chez les quatre souches mentionnées ci-dessus. Cependant, les gènes *tauE* et *oye* ont également été détectés ensemble ou séparément, chez sept et dix souches supplémentaires, respectivement (Figure 28A). La souche ATCC BAA 1163, qui porte le gène *oye* inséré sur le chromosome, apparaît comme un cas unique, car le gène *OEOE\_0812* est intègre chez toutes les autres souches.

### 3.2. Détection et identification des plasmides par analyse des génomes

Les plasmides pOENI-1 et pOENI-1v2 ont été recherchés dans les génomes d'*O. oeni* disponibles au laboratoire et dans les génomes publics. Parmi les 19 génomes séquencés au laboratoire en 2010, 10 proviennent de la collection de 44 souches analysées par PCR (S11, S13, S22, S25, S28, IOEB 0501, IOEB 0608, IOEB 9304, B16 et SB3) et les 9 autres correspondent à des souches utilisées pour d'autres projets du laboratoire (IOEB 0205, 0502, 0607, 8417, 9517, 9613, 9701, 9803 et 9805) (Résultats et discussion, Chapitre 2). Les séquences génomiques des souches IOEB 9613 et 9701 ne sont pas exploitables et n'ont donc pas été analysées. Les 14 génomes d'*O. oeni* déposés dans les banques de données publiques proviennent des souches ATCC BAA 1163, PSU-1 (Mills *et al.*, 2005) et de 12 autres, récemment publiés par Borneman *et al.* (2012a) (séquences non disponibles pour deux d'entre elles au moment de l'analyse). Concernant ces nouveaux génomes, les auteurs ont rapporté avoir détecté des plasmides dans certaines séquences, sans décrire leurs caractéristiques. Les plasmides de type pOENI-1 ont été recherchés dans tous ces génomes à l'aide de l'outil Blast de la base de données NCBI et du logiciel RAST (Aziz *et al.*, 2009). De plus, pour évaluer la proximité phylogénétique des souches séquencées, un arbre basé sur des données de MLST produites à partir des séquences de 6 gènes de ménage a été construit (Figure 28B). Ces données ont été extraites des 29 séquences génomiques disponibles et ont été produites pour 16 des 44 souches de la collection analysée par PCR. Conformément à

**Tableau 9. Recherche des plasmides de type pOENI-1 dans les génomes d'*O. oeni*.**

Souche	Numéro d'accession (GenBank)	N° Contig	Taille (pb)	Identité <sup>a</sup> (%)	Position sur les contigs génomiques	Position sur pOENI-1v2 pOENI-1*	ORFs communes <sup>b</sup>	OE0812 type toute repa	Type de plasmide
AWRIB419 (Lalvin EQ54)	ALAF00000000	42	18431	99	1917 - 18431 - 1918	1 - 1917* 1819 - 18332*	1 - 20	+ + + +	<b>pOENI-1</b>
S11		49	11224	100	1 - 11224	14009 - 3306			
		96	473	100	1 - 473	3307 - 3779			
		1	2014	100	1 - 2014	3790 - 5793	1 - 12		
		204	152	100	1 - 152	5794 - 5945	A - E	+ + + +	
		180	1440	100	1 - 1440	5946 - 7835	13 - 20		
		67	6173	100	6173 - 1	7836 - 14008			
AWRIB429 (VP41)	ACSE00000000	42	5820	99	1 - 5820	7392 - 13211	9 - C		
		46	1979	100	1 - 1979	13189 - 15167	<b>D - F</b>		
		45	2196	99	1 - 2196	15173 - 17368	<b>13 - 15</b>	+ + + +	
		36	11847	99	11847 - 1	17474 - 7414	<b>15 - 9</b>		<b>pOENI-1v2</b>
AWRIB568	ALAJ00000000	22	22031	99	1879 - 22031	1 - 20173	1 - 20	+ + + +	
				99	1 - 1878	20049 - 21926			
AWRIB576 IOEB 0607 <sup>c</sup>	ALAK00000000	24	22005	100	1 - 21926	1 - 21926	1 - 20	+ + + +	
		18	4029	99	4049 - 1	7307 - 11355	9 - 12		
		17	1015	99	1 - 1015	11356 - 12372	<b>A - C</b>		
		43	4136	99	4136 - 2138	12809 - 14807	<b>D - F</b>		
				99	1933 - 1	17797 - 16768	13 - 14	+ + + +	
		9	3187	98	3187 - 1	16997 - 20185	<b>15 - 20</b>		
		89	1853	92	15 - 1827	20001 - 21183	<b>20</b>		
AWRIB422 (CH35)	ALAG00000000	25	21317	99	2312 - 13646	1 - 11355	1 - 12		
				98	14871 - 15363	12375 - 12866	<b>C - D</b>		
				84	19428 - 19761	18248 - 18582	16	- + + +	<b>Plasmide potentiel de type pOENI-1</b> Base répliquante différente
				81	20581 - 21201	18990 - 19609	18-19		
				94	65 - 2311	19679 - 21926	20		
S25		19	9356	97	9356 - 7196	3781 - 5934	<b>4 - 7</b>		
				98	7226 - 1785	5924 - 11335	<b>8 - A</b>	- + + +	<b>Absence</b> Localisation chromosomique suggérée
				99	559 - 95	12375 - 12839	<b>C - D</b>		
AWRIB548 (BL01)	ALAH00000000	28	37131	99	1 - 4260	3651 - 7940	<b>4 - 9</b>		
				82	11368 - 10552	10541 - 11357	12	- + - +	
				97	8273 - 7407	13473 - 14338	<b>E - F</b>		
B16		47	36995	99	1 - 4161	3780 - 7940	<b>4 - 9</b>		
				83	11194 - 10481	10616 - 11329	12	- + - +	<b>Absence</b> Localisation chromosomique suggérée
				97	8174 - 7308	13473 - 14338	E		
IOEB 0205		23	36954	99	1 - 4161	3780 - 7940	<b>4 - 9</b>		
				83	11194 - 10481	10616 - 11329	12	- + - +	
				97	8174 - 7308	13473 - 14338	E		
ATCC BAA 1163	AAUV01000000	39	35036	99	31043 - 27952	7306 - 10397	<b>9 - 11</b>		
				100	27951 - 27134	10558 - 11355	12	- - + -	<b>Absence</b> Localisation chromosomique
PSU-1	CP000411	-						- - - +	
AWRIB553 (Elios)	ALAI00000000	-						- - - +	
AWRIB418 (MCW)	ALAE00000000	-						- - - +	
AWRIB304	AJJJ00000000	-						- - - +	
AWRIB318	ALAD00000000	-						- - - +	
S13		-						- - - +	
S22		-						- - - +	
S28		-						- - - +	
IOEB 9805		-						- - - +	
IOEB 9803		-						- - - +	<b>Absence</b>
IOEB 9517		-						- - - +	
IOEB 9304		-						- - - +	
IOEB 8417		-						- - - +	
SB3		-						- - - +	
IOEB 0608		-						- - - +	
IOEB 0502		-						- - - +	
IOEB 0501		-						- - - +	

a, identité nucléotidique ; b, ORF incomplète indiquée en gras ; c, totalité du plasmide détecté sur différents petits contigs.  
+, présence du gène ; -, absence du gène.

nos attentes, les souches se répartissent en deux groupes génétiques. Le groupe A contient la majorité des levains malolactiques, à l'exception du levain MCW appartenant au groupe B.

Le génome de la souche S11 a permis d'identifier la séquence complète du plasmide pOENI-1v2 détecté par PCR. Six contigs du génome présentent de fortes similarités de séquence avec celui-ci (Tableau 9). Nous avons pu les assembler en réalisant des alignements de séquences avec pOENI-1 et vérifier l'assemblage prédit en réalisant des séries de PCR couvrant la totalité de la séquence. Ce nouveau plasmide est une molécule circulaire de 21926pb que nous avons comparée avec celle de pOENI-1 (Figure 29). Il est constitué de 26 ORFs comprenant celles codées par pOENI-1 et six ORFs supplémentaires localisées précisément entre les ORFs 12 et 13. Cette séquence code une recombinase, trois transposases et deux protéines hypothétiques que l'on retrouve également chez certains plasmides de bactéries lactiques. Cette région exclue, l'identité de séquence nucléotidique entre pOENI-1 et pOENI-1v2 est élevée (96,6%). Parmi les variations observées, deux mutations ponctuelles, à l'origine des ORFs tronquées (4 et 20) chez pOENI-1, n'ont pas été détectées chez pOENI-1v2, pour lequel ces ORFs codent des protéines complètes et probablement fonctionnelles. L'ensemble de ces observations suggèrent que pOENI-1 serait une forme réduite, évoluée, du plus grand plasmide pOENI-1v2. Ce dernier est plus fréquemment répandu, il est présent chez les souches S11, L31 et VP41 (AWRIB429) et l'analyse des séquences génomiques a révélé qu'il est aussi probablement porté par les souches AWRIB568, AWRIB576 et IOEB 0607 (Tableau 9 et Figure 28B).

L'analyse de la séquence génomique du levain malolactique CH35 (AWRIB422) a révélé une troisième forme potentielle d'un plasmide de type pOENI-1. En effet, un contig de 21317pb partage la quasi-totalité des ORFs de pOENI-1, excepté celles codant les systèmes de maintenance et de réplication, et contient également des gènes supplémentaires (Tableau 9). Parmi ces derniers, nous avons noté la présence d'un système de partition, un système d'addiction toxine-antitoxine et une protéine de réplication. Cette dernière a une séquence spécifique, avec seulement 59% et 47% d'identité avec la protéine RepA du plasmide pLR002 de *Lactobacillus rhamnosus* et des plasmides de type pOENI-1/pOENI-1v2, respectivement. Ces observations suggèrent la présence d'un autre plasmide de type pOENI-1 chez le levain malolactique CH35 ; nous l'avons nommé pOENI-1v3 (Figure 28B).



Enfin, le génome du levain malolactique EQ54 (AWRIB419) contient un contig de 18431 pb qui présente 99% de similarité avec la séquence du plasmide pOENI-1 (Tableau 9). Les 99 bases de différence correspondent à une séquence répétée en début et fin du contig qui est liée probablement à une erreur d'assemblage. Cette souche semble donc contenir le plasmide pOENI-1.

### 3.3. Identification des localisations génomiques des gènes *oye* et *tauE*

Parmi l'ensemble des souches étudiées par PCR ou par l'analyse des séquences génomiques, la souche ATCC BAA 1163 est un cas unique décrit par Eric Bilhère (2009) où 4 ORFs plasmidiques (ORFs 9 à 12) incluant *oye* sont intégrées dans un îlot mobile de 10kpb inséré au niveau du gène chromosomique OEOE\_0812 (Introduction, paragraphe 2.1.4). Nous avons observé pour cette souche une délétion de 137 nucléotides comprise entre les ORFs 11 et 12, à l'origine d'une OYE plus courte de 19 acides aminés à l'extrémité C-terminal.

Pour le cas des souches B16, BL01, 450 Preac et IOEB 0205, qui portent uniquement le gène *tauE*, l'alignement de la séquence du plasmide pOENI-1v2 a révélé des similarités avec un contig du génome B16 de 36995pb (Tableau 9). Ce contig compte 35 ORFs et en partage 9 avec pOENI-1v2. A proximité de ces ORFs communes, ils s'en trouvent d'autres codant une protéine de partition et une protéine de réplication qui présente seulement 44% d'identité avec RepA des plasmides de type pOENI-1. Il est donc probable qu'une partie des gènes de ce contig de B16 soit d'origine plasmidique. Cependant, l'autre moitié du contig présente de fortes similarités de séquence (99%) avec le génome de PSU-1 qui ne contient pas de plasmides. Nous avons vérifié l'assemblage de ce contig par des PCR et confirmé qu'il résulte probablement de l'insertion d'une séquence plasmidique dans le chromosome. De plus, la même situation a été détectée dans les génomes des souches BL01 (AWRIB548) et IOEB 0205 (Tableau 9).

L'étude du génome de la souche S25, portant les gènes *tauE* et *oye*, nous a permis d'identifier un contig de 9356pb présentant 97% de similarités de séquence avec pOENI-1v2 et comprenant les ORFs 4 à 12, A, C et D (Tableau 9). Chez cette souche aussi, des tests PCR suggèrent que la séquence plasmidique est probablement intégrée au chromosome. Chez les



souches S14, S24, IOEB S455, les gènes *tauE* et *oye* sont bien présents, mais pas un gène *repA* proche de celui de pOENI-1 ou pOENI-1v2 (Figure 28). Par conséquent, il est possible que ces souches présentent, soit ce cas de figure de la souche S25, soit un plasmide ayant une protéine repA différente, comme pOENI-1v3 de la souche CH35.

La localisation du gène *oye* détecté chez les souches S19, S20, S27, S29 et IOEB S433a n'a pas pu être déterminée, car nous ne disposons pas de leur génome à l'heure actuelle. Néanmoins le génome de la souche S19 est en cours de séquençage et permettra de préciser cette localisation.

### 3.4. Distribution des plasmides de type pOENI-1 et des gènes associés

Au total, par analyse PCR et analyse des séquences génomiques, nous avons recherché les plasmides de type pOENI-1 chez 59 souches d'*O. oeni*. Trois formes de plasmide, pOENI-1, pOENI-1v2 et pOENI-1v3 ont été détectées chez 2 souches (VF et EQ54), 6 souches (S11, IOEB 0607, L31, VP41, AWRIB568 et AWRIB576) et 1 souche (CH35), respectivement (Figure 28B). Les plasmides de type pOENI-1 sont présents chez 33% des levains commerciaux sélectionnés pour leurs propriétés technologiques. Pour comparaison, seulement 8,8% des souches non commerciales portent ces plasmides. La proximité phylogénétique des souches portant, soit pOENI-1, soit pOENI-1v2, suggère qu'ils pourraient être acquis verticalement ; à l'exception des souches S11 et IOEB 0607, qui sont plus distantes et pour lesquelles il est plus probable que pOENI-1v2 ait été acquis par transfert horizontal (Figure 28B).

Les gènes *oye* et *tauE* sont également présents ensemble ou séparément chez de nombreuses autres souches ne portant pas de plasmides de type pOENI-1 (11 et 9 respectivement). Le gène *tauE* est détecté chez 3 levains supplémentaires, il est ainsi présent à hauteur de 53% chez les levains malolactiques. D'après la Figure 28, une distribution aléatoire de ces deux gènes, particulièrement dans le groupe A, est observée, suggérant qu'ils seraient acquis principalement via des événements de transfert horizontal. Cependant, dans la plupart des cas, une souche phylogénétiquement proche porte un plasmide. Il est alors probable que les plasmides soient acquis par transfert horizontal, puis qu'à l'intérieur des sous-groupes génétiques, des événements évolutifs ponctuels soient à l'origine de la



perte du plasmide ou d'insertion chromosomique. Nous notons qu'aucun plasmide de type pOENI-1 n'a été détecté chez les souches du groupe B et que seule la souche ATCC BAA 1163 porte le gène *oye* au niveau chromosomique.

**Tableau 10. Détermination du nombre de copies de plasmide par cellule.**

Souche	Type du plasmide	<i>oye</i> (copies/ $\mu$ l)	<i>rpoB</i> (copies/ $\mu$ l)	Copies/cellule
VF	pOENI-1	$7,7 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3 \pm 0,7 \times 10^3$	$3,7 \pm 0,6$
VP41	pOENI-1v2	$6,6 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$	$4,7 \pm 0,2$
L31	pOENI-1v2	$2,3 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3 \pm 2,4 \times 10^3$	$3,7 \pm 1,2$
S11	pOENI-1v2	$6,8 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$	$3,3 \pm 0,4$

Moyenne  $\pm$  écart-type.

## 4. Nombre de copies par cellule et stabilité des plasmides

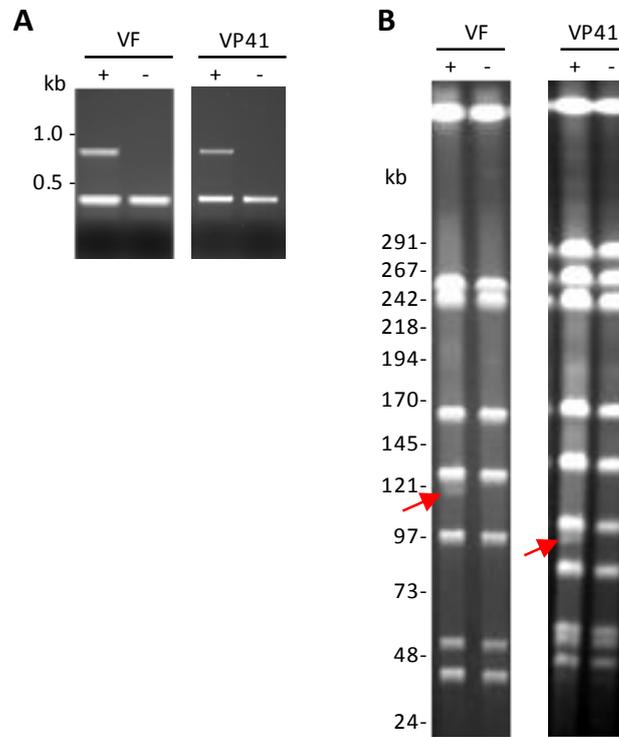
### 4.1. Nombre de copies des plasmides par cellule

Pour mieux caractériser et comparer ces plasmides, le nombre de copies par cellule a été déterminé chez quatre souches hôtes (VF, VP41, L31, S11) par l'analyse quantitative du gène plasmidique *oye* (*oyeQ1* – *oyeQ2*) et du gène chromosomique *rpoB* (*rpoBqFO* – *rpoBqRO*) qui n'est présent qu'à une copie par cellule. *O. oeni* ne possédant qu'un seul chromosome, le rapport des deux valeurs obtenues par PCR quantitative, pour un même échantillon, permet d'estimer le nombre de copies de plasmides par cellule.

La détermination a été réalisée par PCR quantitative sur colonies. Nous avons fait ce choix car l'analyse quantitative à partir d'ADN génomique extrait selon le protocole classique est à l'origine d'une sous-estimation du nombre de copies de plasmide, comme le remarque également Bilhère (2009). Cette observation peut s'expliquer, soit par des conditions d'extraction non adaptées aux plasmides, soit par des efficacités de PCR variables selon les matrices. Pour chacune des quatre souches (VF, VP41, L31, S11), trois colonies ont été piquées au hasard et analysées par PCR quantitative. Les résultats indiquent et confirment que pOENI-1 et pOENI-1v2 sont présents en faible nombre de copies : en moyenne 3,8 copies par cellule, quelque soit la souche et le plasmide considéré (Tableau 10). Des analyses par PCR quantitatives ont également été réalisées sur les souches (S14, S19, S20, S24, S25, S27, S29, IOEB S433a, IOEB S455) portant le gène *oye* au niveau d'un autre locus, supposé chromosomique. Ce gène a été détecté en moyenne à  $1,1 \pm 0,2$  copies par cellule pour l'ensemble des souches, ce qui supporte l'hypothèse d'une localisation chromosomique.

### 4.2. Obtention de clones dépourvus de plasmides.

Pour faciliter la recherche du ou des phénotypes conférés par les plasmides de type pOENI-1, nous avons tenté d'obtenir des clones les ayant perdu spontanément. Un clone de la souche VF dépourvu de pOENI-1 avait été obtenu précédemment en cultivant la bactérie dans un milieu de laboratoire pendant une quinzaine de générations (Bilhère, 2009). Nous avons suivi le même protocole pour obtenir des clones sans plasmides à partir des souches



**Figure 30. Contrôle des souches dépourvues de plasmides. (A)** La présence (+) et l'absence (-) des plasmides chez les souches VF et VP41 a été confirmée par PCR multiplex ciblant l'ORF 20 (amplicon de 821pb) et le gène *mleA* (430pb). **(B)** Le profil de restriction NotI-PFGE des souches dépourvues de plasmides (-) a été comparé à celui des souches hôtes (+). Les flèches rouges indiquent des bandes correspondant probablement aux plasmides pOENI-1 (VF+) et pOENI-1v2 (VP41+). De part leur conformation, la distance de migration ne reflète pas leur taille réelle. Les marqueurs de poids moléculaires (kb) sont indiqués à gauche des figures.

S11, L31 et VP41. Les bactéries ont été inoculées dans du milieu " jus de raisin " et repiquées dans du milieu frais avant qu'elles n'entrent en phase stationnaire de croissance. Avant chaque repiquage, un échantillon a été étalé sur boîte de Pétri et 30 colonies ont été analysées par PCR multiplex, ciblant le gène chromosomique *mleA* (OO1-OO2) comme contrôle positif et l'ORF 20 du plasmide (*orf20a-orf20b*).

Suite à un problème technique, les essais concernant la souche L31 ont été stoppés au bout de 12 générations, sans qu'aucun des clones analysés n'ait perdu le plasmide pOENI-1v2 à ce stade. Pour la souche S11, aucun clone dépourvu de pOENI-1v2 n'a également été obtenu au bout de 36 générations, ce qui dénote une certaine stabilité du plasmide chez ces souches. Néanmoins, un premier clone de la souche VP41 ayant perdu le plasmide pOENI-1v2 a été obtenu après environ 12 générations, ce qui représente 3% des cellules totales et 0,25% des cellules par génération. Il semble donc que les plasmides soient plus ou moins stables selon l'hôte bactérien dans lequel ils se trouvent, mais il serait nécessaire de répéter ces tests dans différentes conditions de culture pour s'en assurer, ce qui n'était pas l'objectif recherché. Une analyse par PCR et par profil de restriction NotI-PFGE a confirmé que nous avons bien obtenu des clones dérivant des souches VF et VP41 et dépourvus des plasmides pOENI-1 et pOENI-1v2, respectivement (Figure 30).

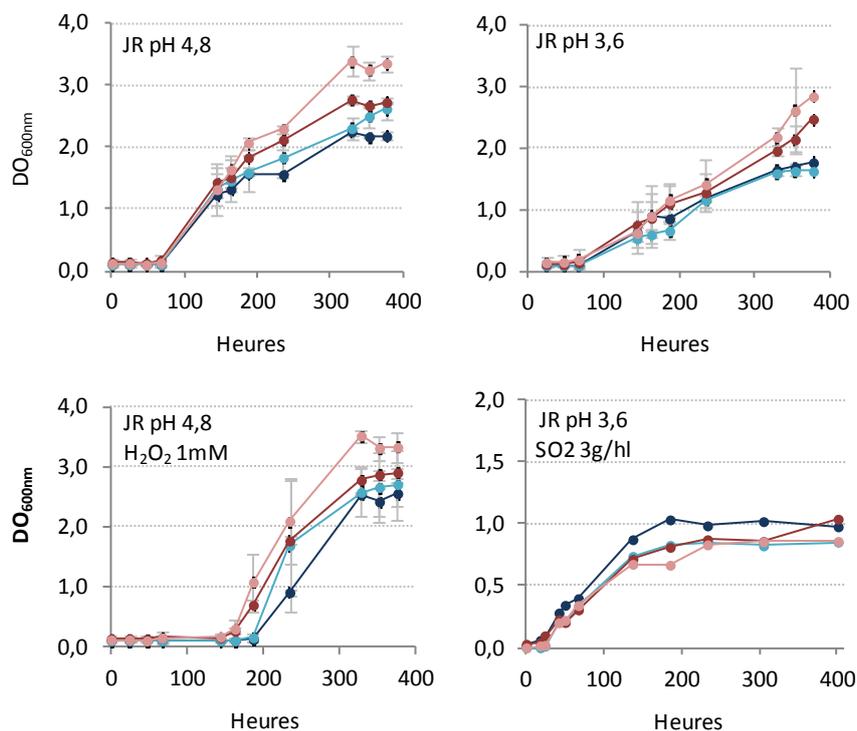
### 4.3. Evaluation de la stabilité des plasmides au cours de la vinification

La relative instabilité de pOENI-1 et pOENI-1v2 en milieu de laboratoire nous a conduit à évaluer leur stabilité au cours de la vinification. Pour cela, les souches VF et VP41 ont été inoculées à  $10^3$  cellules/ml en même temps que des levures sèches actives (souche F33, 200 mg/L) dans un moût obtenu à partir de jus de raisin commercial. La FA a été suivie par mesure de la perte de poids et la FML par dosage de l'acide L-malique. La stabilité des plasmides a été déterminée au moment de l'inoculation dans le vin, en fin de FA (13 jours après inoculation) et en fin de FML (20 jours après inoculation), en testant 10 colonies de chaque échantillon cultivé en milieu " jus de raisin " par la PCR multiplex *mleA*/ORF20. A l'inoculation, environ 90% des cellules contenaient un plasmide, ce qui résulte probablement de l'instabilité des plasmides au cours des précultures (voir Tableau 12, page 87). Après FA, seulement 70% des clones VF contenaient pOENI-1, alors que 90% des clones VP41



possédaient encore pOENI-1v2. En fin de FML, 90 à 100% des clones possédaient les plasmides.

La présence des plasmides après une étape de lyophilisation a également été vérifiée sur 4 lyophilisats de la souche VF et 3 de la souche VP41. Après une étape de réhydratation, les suspensions cellulaires ont été cultivées sur milieu " jus de raisin " et 10 colonies ont été analysées par la PCR multiplex *mleA*/ORF20. Dans chaque préparation lyophilisée, tous les clones testés portaient encore les plasmides de type pOENI-1. Ainsi, les deux plasmides sont bien conservés par les bactéries à la fois au cours de la lyophilisation et de la vinification.



**Figure 31. Cinétiques de croissance des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- en présence de différents facteurs de stress.** La croissance des souches a été suivie en milieu " jus de raisin " par mesure de densité optique  $DO_{600nm}$  selon différentes conditions : classique (pH 4,8 ; 25°C), acide (pH 3,6),  $H_2O_2$  (1mM),  $SO_2$  (3 g/hl). Les courbes présentées correspondent à la moyenne de trois expériences ; excepté pour la condition  $SO_2$ . Bleu clair, VF+ ; bleu foncé, VF- ; rouge clair, VP41+, rouge foncé, VP41-.

**Tableau 11. Paramètres mesurés au cours de la production sous forme lyophilisée.**

Souche	Culture		Sédiment		Lyophilisat		Rendement de production (g/l)
	pH final	Masse du culot (g)	Masse (g)	Population viable (cellules/g)	Masse (g)	Population viable (cellules/g)	
VF-	3,68 ± 0,01	1,57 ± 0,49	3,53 ± 0,50	2,7 ± 0,4 × 10 <sup>11</sup>	0,424 ± 0,034	4,7 ± 1,3 × 10 <sup>11</sup> *	20,0 ± 5,3 **
VF+	3,71 ± 0,03	1,73 ± 0,76	3,57 ± 0,55	2,2 ± 0,4 × 10 <sup>11</sup>	0,431 ± 0,038	7,8 ± 1,3 × 10 <sup>11</sup> *	33,7 ± 6,2 **
VP41-	3,68 ± 0,03	1,57 ± 0,50	3,47 ± 0,29	1,8 ± 0,8 × 10 <sup>11</sup>	0,407 ± 0,016	3,1 ± 2,4 × 10 <sup>11</sup>	12,5 ± 9,5
VP41+	3,70 ± 0,02	1,53 ± 0,47	3,50 ± 0,36	2,2 ± 0,4 × 10 <sup>11</sup>	0,448 ± 0,035	1,9 ± 0,9 × 10 <sup>11</sup>	8,8 ± 4,8

Moyenne ± écart-type ; \*, Test de student, p\_value < 0,05.

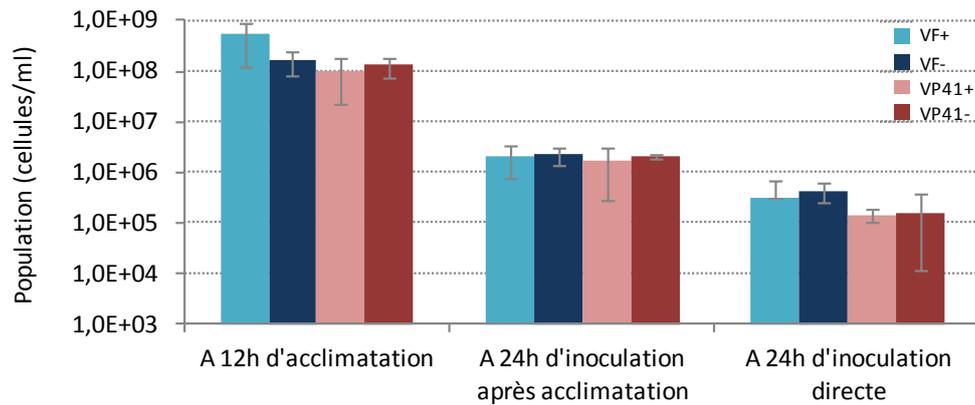
## 5. Recherche de phénotypes associés aux plasmides de type pOENI-1

### 5.1. Capacités de résistance à différents facteurs de stress

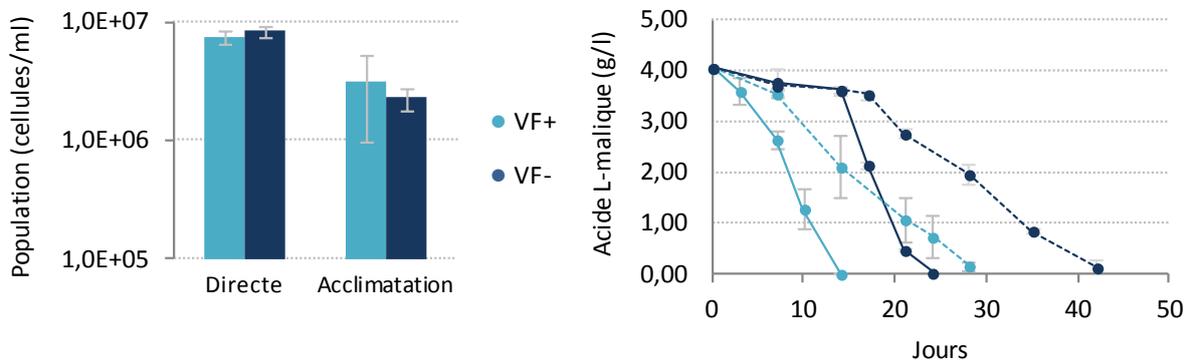
La croissance des souches hôtes (VF+, VP41+) et des souches dépourvues de plasmides (VF-, VP41-) a été comparée en présence de différents facteurs de stress rencontrés dans le vin (pH, alcool, SO<sub>2</sub>, stress oxydatif). Pour chacune, une préculture en milieu " jus de raisin " a été amenée en phase exponentielle, puis inoculée dans le milieu expérimental. Les croissances bactériennes ont été suivies quotidiennement par mesure de la densité optique à 600nm. Les cinétiques de croissance sont similaires dans l'ensemble des conditions testées (Figure 31). Quelque soit le stress appliqué, les souches VF+ et VF- se sont développés similairement. Leur croissance a été ralentie à pH acide et en présence de SO<sub>2</sub> et la phase de latence a nettement été allongée lors du stress oxydatif. La souche VP41+ a produit une biomasse plus importante que VP41- en fin de phase exponentielle, notamment en condition classique ou de stress oxydatif ; mais ces différences minimes ne traduisent pas un réel gain lié à la présence du plasmide. L'effet de la teneur en éthanol (12%), de différents pH (3,0 et 3,3) et d'autres concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 et 4mM) n'a pas révélé de différences de croissance entre les souches.

### 5.2. Capacités de résistance à l'étape de congélation-lyophilisation

Maintenus chez les levains malolactiques VF et VP41, les plasmides de type pOENI-1 pourraient conférer un avantage adaptatif lors de l'étape de production sous forme lyophilisée. Pour tester cette hypothèse, les souches avec ou sans plasmide ont été cultivées en milieu " jus de pomme " et produites sous forme lyophilisée selon le protocole industriel adapté au laboratoire (Matériels et Méthodes, paragraphe 1.3). Différentes mesures ont été effectuées pour évaluer l'impact de la lyophilisation sur les souches (Tableau 11). Aucune variabilité n'a été observée lors des étapes précédant la lyophilisation entre VF+, VP41+ et VF-, VP41-, respectivement. Les masses de lyophilisat récoltées après l'étape de congélation-lyophilisation étaient également similaires. Par contre, une différence significative (Test de Student :  $t = -2,944$  ;  $p\_value < 0,05$ ) entre VF+ et VF- a été mesurée pour la concentration cellulaire des lyophilisats et par conséquent, pour le rendement de production des souches



**Figure 32. Population de cellules viables après acclimatation et après inoculation dans le vin.** Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences associées aux écart-types. Taux d'inoculation : dans le milieu d'acclimatation,  $10^{11}$  cellules/ml ; dans le vin,  $10^7$  cellules/ml.



**Figure 33. Comparaison des souches VF+ et VF- au cours de la FML dans un vin modèle.** Les cinétiques fermentaires des souches ont été évaluées selon deux modes d'inoculation : inoculation directe ou après une période d'acclimatation. **(A)** Le niveau de population a été contrôlé par épifluorescence après 24h d'inoculation des bactéries à  $10^7$  cellules/ml. **(B)** Les cinétiques de dégradation de l'acide L-malique correspondent au mode d'inoculation directe (ligne en pointillé) ou après acclimatation (ligne continue). Les valeurs correspondent à la moyenne de deux expériences.

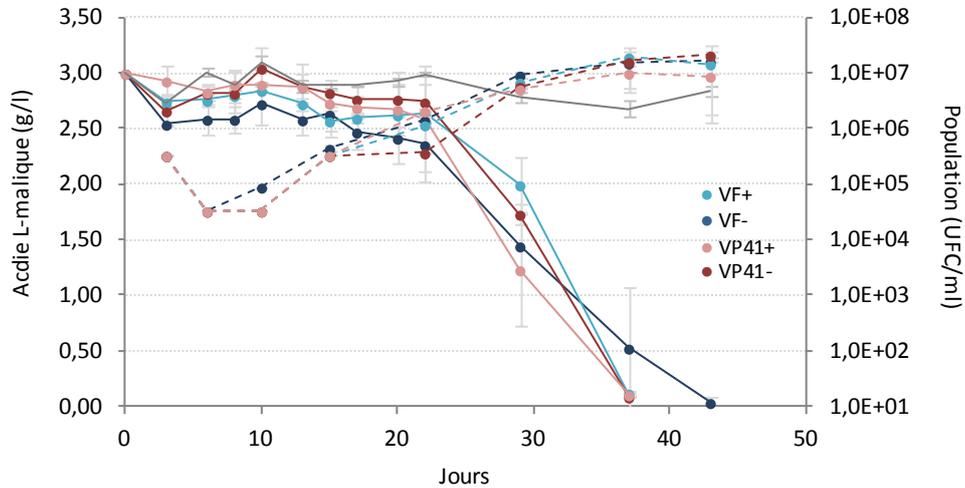
(Test de Student :  $t = -2,880$  ;  $p\_value < 0,05$ ). Une mortalité plus importante de la souche VF- lors de l'étape de congélation-lyophilisation est probablement à l'origine de cette différence. Cependant, cette observation n'a pas été confirmée chez les souches VP41+ et VP41-.

### 5.3. Capacités de survie à l'inoculation dans le vin

Les souches lyophilisées (VF+, VF-, VP41+ et VP41-) ont été inoculées dans un vin avec ou sans une phase d'acclimatation (12h) et leur survie a été évaluée après la phase de acclimatation ou 24h après l'inoculation dans le vin, par dénombrement des cellules viables par épifluorescence. Aucune différence significative entre les souches n'a été mise en évidence (Figure 32). Nous notons la diminution drastique des cellules viables lors d'une inoculation directe et au cours de la période d'acclimatation, qui, par la suite améliore la survie des cellules dans le vin. Des essais supplémentaires menés sur deux autres vins (Cabernet et Merlot) visaient à mesurer la survie des souches acclimatées après inoculation et ont confirmé ces résultats.

### 5.4. Capacités à mener la FML

Le premier essai réalisé au tout début de l'étude concernait seulement les souches VF+ et VF-. Préparées sous forme lyophilisée, elles ont été comparées lors de microvinifications afin de déterminer si le plasmide pOENI-1 confère un avantage à la souche au cours de la FML. Les souches VF+ et VF- ont étéensemencées à  $10^7$  cellules/ml dans le vin modèle préparé au laboratoire à partir de jus de raisin commercial, selon deux modes d'inoculation : inoculation après réhydratation des lyophilisats dans de l'eau distillée ou après acclimatation dans le vin dilué au demi et enrichi en extraits de levures. Le niveau de population a été contrôlé 24 heures après l'ensemencement du vin par épifluorescence et la dégradation de l'acide L-malique a été suivie deux fois par semaine (Figure 33). Quelque soit le mode d'inoculation, la souche VF+ a mené la FML plus rapidement que la souche VF-, malgré des niveaux de population similaires 24h après l'inoculation dans le vin. Cette différence est associée à la durée de la phase de latence chez la souche VF+, réduite de 11 jours après inoculation directe et de 10 jours après un période d'acclimatation.

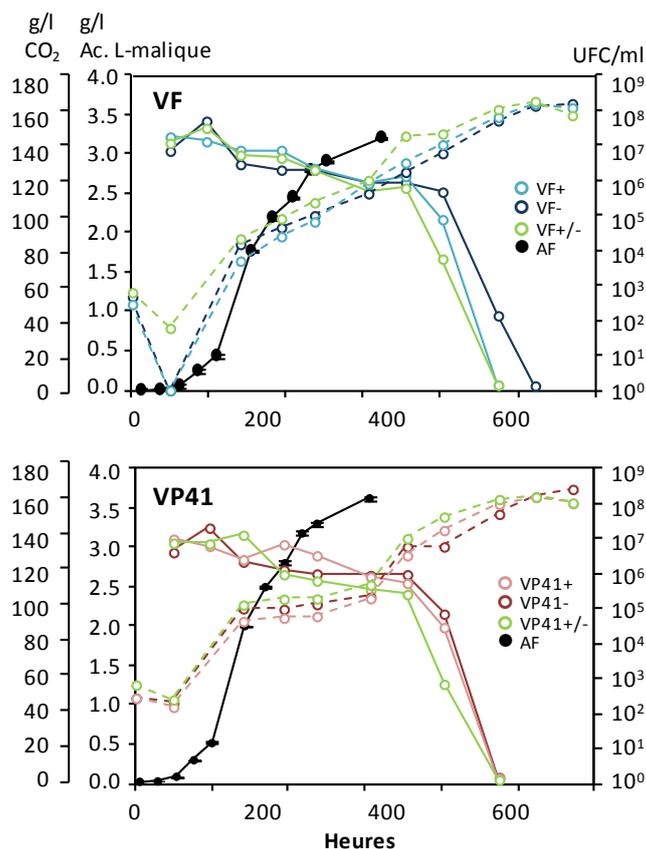


**Figure 34. Comparaison des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- au cours de la FML dans un vin de Merlot.** Les cinétiques de dégradation de l'acide L-malique (ligne continue) et de population bactérienne (ligne en pointillé) ont été suivies après l'inoculation des bactéries ( $10^7$  cellules/ml) dans un vin rouge contenant 3 g/l d'acide L-malique. Un contrôle de fermentation spontanée sans ajout de bactéries a été réalisé (gris). Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répétitions biologiques (deux lyophilisats produits indépendamment).

Pour confirmer ces résultats, de nouveaux lyophilisats ont été produits avec les souches VF et VP41 et des essais de microvinification ont été menés sur un vin de Merlot récolté après la FA (pH 3,6 ; 13,4% vol ; SO<sub>2</sub>T 26 mg/l ; SO<sub>2</sub>L 4 mg/l ; acide L-malique 3 g/l). Les souches ont été préalablement acclimatées afin d'assurer le départ des fermentations, car ce vin est plus contraignant que le vin modèle par son degré d'alcool et par la présence de SO<sub>2</sub> libre. En parallèle des suivis de fermentation, un suivi de population a également été réalisé par dénombrement sur milieu solide (Figure 34). Quelle que soit la souche (VF+, VF-, VP41+ et VP41-), les populations bactériennes ont évolué similairement au cours de la FML. Elles ont décliné rapidement après l'inoculation et se sont développées après 5 à 10 jours pour atteindre environ 10<sup>7</sup> cellules/ml en fin de FML. Les souches ont commencé à consommer l'acide L-malique de manière significative aux alentours de 20 jours et ont achevée la FML en 37 et 43 jours après l'inoculation. Seule une légère différence entre les souches VF+ et VF-, bien moins nette que lors des précédents essais, a été observée. En moyenne, la souche VF+ a terminé la FML 6 jours avant la souche VF-. En revanche, des cinétiques fermentaires similaires ont été observées pour les souches VP41+ et VP41-.

### **5.5. Capacités à se développer au cours des étapes précédant la FML**

Dans cette partie, nous avons tenté de savoir si les plasmides pOENI-1 et pOENI-1v2 pourraient conférer un avantage adaptatif permettant aux cellules hôtes de survivre préférentiellement au cours des étapes de la vinification précédant la FML. Pour cela, les souches seules avec ou sans plasmides (VF+, VP41+, VF-, VP41-) et un mélange des deux en proportion égale (VF+/VF- et VP41+/VP41-, 1 : 1) ont été inoculées à 10<sup>3</sup> cellules/ml dans un moût de raisin rouge en même temps que des levures sèches actives (F33, 200 mg/l). Le suivi des fermentations (FA et FML) et le suivi de la population bactérienne ont été réalisés pour chaque modalité (Figure 35). Les quatre souches inoculées séparément se sont développées similairement au cours de la vinification et trois d'entre elles ont dégradé la totalité de l'acide L-malique en 20 jours après l'inoculation dans le moût. En accord avec les résultats précédents, la souche VF- a terminé la FML quelques jours après la souche VF+, mais dans ce cas, seulement deux jours plus tard.

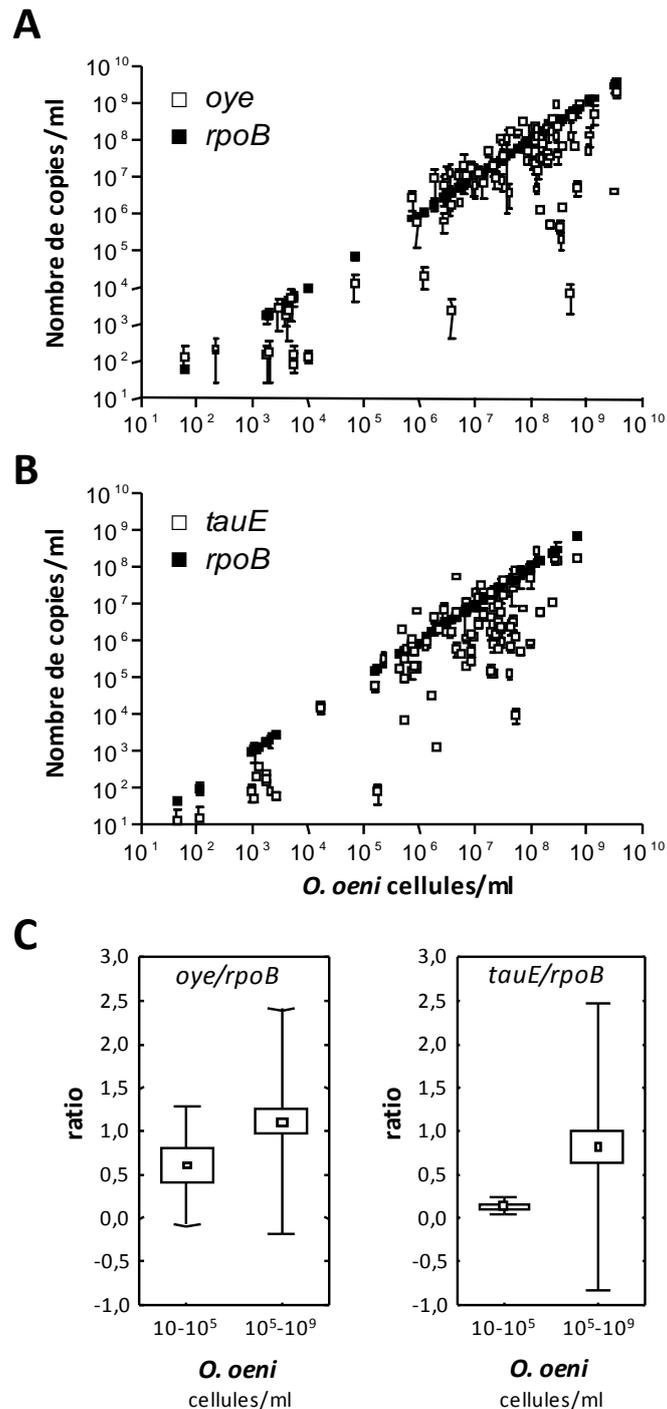


**Figure 35. Comparaison des souches VF+, VF- et VP41+, VP41- au cours de la vinification.** Les cinétiques des FA (dégagement de CO<sub>2</sub>, noir), des FML (ligne continue) et des populations bactériennes (ligne en pointillé) ont été suivies dans un moût de raisin inoculé avec la levure sèche active F33 (200mg/l) et avec les souches bactériennes seules ou en mélange (10<sup>3</sup> cellules/ml). Les cinétiques de FA correspondent à la moyenne des trois expériences.

**Tableau 12. Pourcentage de cellules avec et sans plasmide à différents temps de la vinification.**

Modalité	Inoculation	Fin FA	Fin FML
VF-	100	100	100
VF+	90	70	90
VF+/VF-	42 / 58	46 / 54	57 / 43
VP41-	100	100	100
VP41+	90	90	100
VP41+/VP41-	50 / 50	49 / 51	45 / 55

Des cinétiques similaires ont été obtenues pour les modalités contenant un mélange des souches VF+ et VF- ou VP41+ et VP41- (Figure 35). Pour déterminer si les souches hôtes se sont développées au détriment des souches dépourvues de plasmide, des échantillons de vin ont été prélevés et déposés sur milieu " jus de raisin " au moment de l'inoculation, à la fin de la FA (à 13 jours) et de la FML (à 20 jours). A chaque fois, 50 colonies ont été analysées par la PCR multiplex *mleA/ORF20* pour évaluer la proportion de clones avec et sans plasmides. Selon les résultats précédents, les plasmides sont stables au cours de la vinification chez les souches hôtes, ce qui indique que les clones dépourvus de plasmide détectés ici correspondent bien aux souches VF- ou VP41- inoculées dans le moût. Le rapport VF+/VF- est passé de 42/58 au moment de l'inoculation, à 57/43 à la fin de la FML (Tableau 12). Ce résultat ne permet pas pour autant de conclure à un avantage lié au port du plasmide, bien qu'il soit maintenu de façon stable au cours de la vinification. De plus, cette observation n'est pas confirmée par les rapports VP41+/VP41- obtenus au cours de la vinification qui étaient de 50/50 à l'inoculation et de 45/55 à la fin de la FML.



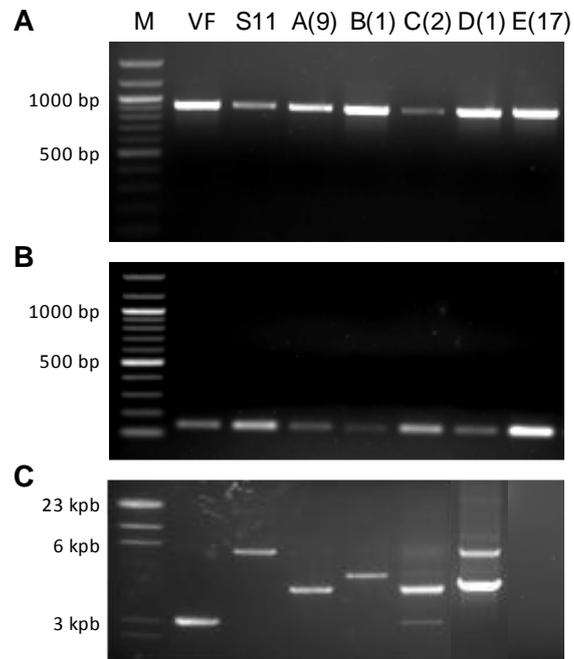
**Figure 36. Fréquence des gènes *tauE* et *oye* au cours des fermentations du vin. (A,B)** Les gènes *tauE* et *oye* ont été quantifiés par PCR quantitative dans 95 échantillons collectés à différents stades de vinification. Les données obtenues pour le gène *rpoB* ont été représentées sur l'axe des abscisses pour évaluer la population d'*O. oeni* et sur l'axe des ordonnées pour faciliter la comparaison entre la population d'*O. oeni* (*rpoB*, carré noir) et le nombre de copies des gènes *tauE* ou *oye* (carré blanc). Les valeurs correspondent à la moyenne de deux quantifications indépendantes. **(C)** Les ratios moyens *tauE/rpoB* or *oye/rpoB* ont été calculés à partir des échantillons collectés avant la FML ( $10^5$ - $10^5$  cellules/ml) et au cours de la FML ( $10^5$ - $10^9$  cellules/ml). Les boxplots représentent la moyenne (petit carré), l'erreur standard (grand rectangle) et l'écart-type (ligne).

## 6. Fréquence des plasmides de type pOENI-1 dans les vins

Au cours de ce travail, nous avons également recherché si les plasmides avaient une signification technologique au cours des vinifications en évaluant leur présence dans 95 échantillons provenant de 86 caves de la région bordelaise et prélevés à différentes phases de la vinification (moût, FA, FML). Aucun levain malolactique n'a été utilisé lors de ces vinifications. Les ADN microbiens purifiés à partir de 10ml de chaque échantillon ont été utilisés comme matrice pour la réalisation de PCR quantitatives visant à déterminer le nombre de copies des gènes *tauE* (8a-8b) et *oye* (*oyeQ1-oyeQ2*). Une PCR quantitative spécifique du gène chromosomique *rpoB* (*rpoBqFO-rpoBqRO*) a aussi été réalisée pour évaluer la population totale d'*O. oeni*.

Comme attendu, la population d'*O. oeni* dans les échantillons de moût ou prélevés en cours de FA est faible ( $<10^4$  cellules/ml), alors qu'elle atteint jusqu'à  $10^9$  cellules/ml au cours des FML (Figure 36A et Figure 36B). Les gènes *tauE* et *oye* ont été détectés dans tous les échantillons à des concentrations variant, selon le stade prélèvement, de moins de  $10^2$  à  $2,0 \times 10^9$  copies/ml. Lors des étapes précédant la FML, le nombre de copies des gènes *tauE* et *oye* est, pour la plupart des cas, inférieur à celui du gène *rpoB*. Par contre, ils sont présents en grand nombre de copies dans la majorité des échantillons prélevés au cours de la FML, supérieur à  $10^6$  copies/ml dans 55,8% (*tauE*) et 78,9% (*oye*) des échantillons et atteignent en moyenne la population d'*O. oeni*. Les ratios moyens *tauE/rpoB* et *oye/rpoB* calculés pour les échantillons de moût ou de FA (0,12 et 0,60 respectivement) sont inférieurs à ceux obtenus pour les échantillons provenant de FML (0,82 et 1,11 respectivement) (Figure 36C). Ces résultats suggèrent une sous-représentation des populations portant ces gènes lors des étapes précédant la FML et une prédominance de ces mêmes populations au cours de la FML. Cependant, cette conclusion demeure relative au vue de la grande variabilité observée au sein des échantillons.

Trente échantillons de vin collectés au cours de la FML ont également été testés par PCR afin de déterminer si la présence des gènes *tauE* et *oye* était associée à celle des plasmides pOENI-1 et pOENI-1v2. Le gène *repA* (*repA1-repA2*) codant la protéine de réplication de ces plasmides et la région variable localisée entre les ORFs 12 et 13 (*oye1-*



**Figure 37. Détection de pOENI-1 et des plasmides associés dans les vins.** Les analyses PCR ont été réalisées sur les ADN des souches d'*O. oeni* VF (pOENI-1), S11 (pOENI-1v2) et de 30 échantillons de vins collectés au cours de la FML (A – E). Le nombre d'échantillons détectés pour chaque profil identifié est indiqué entre parenthèses. Les gènes *repA* (A), *tauE* (B) et une séquence entre les ORFs 11 et 13 (C) ont été recherchés pour déterminer la présence des plasmides de type pOENI-1. M : marqueur de taille moléculaire.

orf13.2) ont été recherchés par PCR. Selon l'analyse des génomes, la détection de ces deux séquences signe la présence d'un plasmide de type pOENI-1. Tous les échantillons contenaient le gène *repA*, mais la région variable a été amplifiée pour seulement 13 d'entre eux (Figure 37). Des produits PCR de tailles moléculaires attendues pour les plasmides pOENI-1 (2376pb) et pOENI-1v2 (5942pb) ont été détectés dans 3 échantillons contenant deux amplicons. Ceci dénote la présence de différentes souches portant différents plasmides de type pOENI-1 au cours de la FML dans un même vin. En effet, des tailles intermédiaires de l'ordre de 4kb ont été observées, suggérant l'existence d'autres plasmides de ce type. Les 17 échantillons qui ne génèrent pas de produits PCR présentent les gènes *repA*, *oye*, et *tauE* ; la présence d'un plasmide de type pOENI-1 est fortement supposée, car l'analyse des génomes révèle que la présence du gène *repA* est toujours associée à ces plasmides.



## 7. Discussion

### 7.1. Plasmides d'*O. oeni*

Les plasmides ont été longtemps considérés comme des éléments peu fréquents chez *O. oeni* et leur contribution dans la diversité génétique et phénotypique de l'espèce est méconnue (Orberg and Sandine, 1984 ; Janse *et al.*, 1987 ; Cavin *et al.*, 1988 ; Fremaux *et al.*, 1993 ; Kelly *et al.*, 1993 ; Prevost *et al.*, 1995 ; Zavaleta *et al.*, 1997 ; Mesas *et al.*, 2011). Les plasmides de petite taille sont facilement détectables et sept d'entre eux ne codant aucune fonction accessoire ont été séquencés et caractérisés (Fremaux *et al.*, 1993 ; Brito *et al.*, 1996 ; Zuniga *et al.*, 1996 ; Alegre *et al.*, 1999 ; Mesas *et al.*, 2001). D'ailleurs, ils sont parfois recherchés pour établir une caractérisation et une discrimination génétique des souches d'*O. oeni* (Zavaleta *et al.*, 1997). Une étude très récente basée sur la comparaison de 14 génomes d'*O. oeni* relate également la présence de " petits " plasmides chez quatre d'entre eux (Borneman *et al.*, 2012a). Mais difficiles à purifier, les plasmides de grande taille ont été rarement détectés chez *O. oeni*. Ils semblent être pourtant présents chez de nombreuses souches d'*O. oeni* (Sgorbati *et al.*, 1985 ; Sgorbati *et al.*, 1987 ; Prevost *et al.*, 1995 ; Brito and Paveia, 1999) et sont susceptibles de porter des fonctions accessoires. La production d'histamine chez *O. oeni* a par exemple été associée à la présence d'un plasmide instable d'environ 20kpb (Lucas *et al.*, 2008).

Plusieurs critères combinés peuvent être à l'origine de la difficulté rencontrée pour purifier les plasmides de grande taille : instabilité et faible nombre de copies, lyse cellulaire peu efficace, conditions de laboratoire (Barton *et al.*, 1995 ; Friehs, 2004 ; Li *et al.*, 2007). Chez *O. oeni*, il semble que la principale cause soit le faible nombre de copies de plasmide par cellule et l'instabilité plasmidique. En effet, les génomes de deux souches IOEB 0607 et IOEB 0608 capables de produire de l'histamine ne contiennent pas les gènes de cette voie de biosynthèse sur les séquences assemblées. Ils sont seulement détectés sur les séquences brutes avec une couverture de séquençage de 1X-2X (contre 20-40X pour le reste des génomes) indiquant que toutes les cellules de ces deux souches ne contiennent pas ce plasmide (non montré). Au cours de nos essais de purification, nous avons remarqué qu'un seul repiquage suffit pour que certaines souches perdent ces éléments. La purification de ces



plasmides est donc une tâche difficile. Après de nombreux essais, nous avons obtenu un protocole basé sur la lyse alcaline et la migration par champs pulsé qui permet de visualiser les grands plasmides d'*O. oeni*. Cependant, ce protocole est difficile à réaliser et nécessiterait une extraction sur de plus grands volumes pour obtenir des quantités d'ADN plasmidiques exploitables pour leur séquençage ou d'autres analyses. En l'état, nous n'avons pas pu l'utiliser pour établir un inventaire des contenus en plasmides des souches d'*O. oeni*.

## 7.2. Plasmides de la " famille pOENI-1 "

Les plasmides pOENI-1 (Bilhère, 2009) et pOENI-1v2 sont les premiers grands plasmides décrits chez *O. oeni*. Ils portent une majorité d'ORFs impliquées dans les mécanismes de réplication, maintenance et conjugaison et conservées chez d'autres plasmides de bactéries lactiques. Le plasmide 1 de *Lactobacillus casei* est un des plus similaires et le seul à partager l'origine de réplication. Il partage une région d'environ 6kpb comprenant les gènes *parA/parB* (partition), *repA* (réplication), *relB/pemK* (système toxine-antitoxine) et *traA* (transfert). Les plasmides de type pOENI-1 se répliquent probablement par le mécanisme de réplication thêta. En effet, ils présentent toutes les caractéristiques de ce type de plasmide : une protéine de réplication RepA similaire à celles portées par des plasmides utilisant ce mode de réplication (Fang *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Ito *et al.*, 2009), un faible nombre de copies par cellule (Shumacher, 2011), une origine de réplication riche en bases AT et contenant des itérons (Chattoraj, 2000 ; Rajewska *et al.*, 2011). Le réplicon identifié (origine de réplication + protéine de réplication) ne présente pas de similarités élevées avec d'autres bases répliquatives et semble spécifique de ces plasmides pOENI-1 et pOENI-1v2.

Lors de nos travaux, différentes formes plasmidiques ont été observées, notamment pOENI-1v2, qui est de plus grande taille. Il n'y a aucun doute sur le fait que ces deux plasmides dérivent l'un de l'autre puisqu'ils partagent plus de 96% d'identité nucléotidique sur la séquence totale de pOENI-1. Leur principale différence correspond à une région de 3,5kpb entre les ORFs 12 et 13, qui est présente chez pOENI-1v2 et absente chez pOENI-1. Cette séquence code une recombinase, des transposases et deux protéines hypothétiques sans rôle fonctionnel évident. Ces plasmides diffèrent également par la présence d'ORFs



tronquées (4 et 20) chez pOENI-1, non détectées sur le plasmide pOENI-1v2, pour lequel une glycérate déshydrogénase et une nickase ont été identifiées, respectivement. Pour ces raisons, pOENI-1v2 précède probablement pOENI-1 au cours de l'évolution. Cependant, il reste difficile d'évaluer si pOENI-1v2 est l'ancêtre direct puisque l'analyse des échantillons de vin suggère qu'il existe au moins deux plasmides supplémentaires de tailles intermédiaires appartenant à la " famille pOENI-1 ". Une de ces formes semble plus fréquente dans les vins que les autres ; elle a été détectée dans 12 échantillons sur 13 analysés. De plus, notre analyse des nouvelles séquences génomiques publiées par Borneman *et al.* (2012a) a confirmé la présence de plasmides, dont certains sont identiques à pOENI-1 et pOENI-1v2, et en a mis en évidence un troisième, que nous avons désigné pOENI-1v3. Ce dernier contient 21317pb et partage la totalité des ORFs de pOENI-1, à l'exception des systèmes de partition et de réplication qui lui sont spécifiques. Comme pOENI-1v2, il code une glycérate déshydrogénase (ORF 4) et une nickase (ORF 20) probablement fonctionnelles.

Les plasmides pOENI-1, pOENI-1v2 et pOENI-1v3 ne contiennent pas l'ensemble des protéines (plus d'une dizaine) nécessaires à la conjugaison (Ito *et al.*, 2009). Cependant, pOENI-1v2 et pOENI-1v3 codent une nickase (ORF 20, tronquée chez pOENI-1), protéine de transfert typique des plasmides mobilisables de bactéries lactiques (Fang *et al.*, 2008). Cela suggère qu'ils peuvent au moins se propager via le mécanisme de mobilisation qui repose sur le transfert d'une molécule mobilisable d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif. La répartition des plasmides de type pOENI-1 chez 59 souches d'*O. oeni* analysées au cours de ce travail soutient l'hypothèse selon laquelle ils ont parfois été échangés par transfert horizontal. Parmi les neuf souches portant pOENI-1 (VF, EQ54), pOENI-1v2 (L31, VP41, S11, IOEB 0607, AWRIB568, AWRIB576) ou pOENI-1v3 (CH35), certaines sont étroitement liées sur l'arbre phylogénétique obtenu par MLST, suggérant qu'elles ont acquis leurs plasmides verticalement ; d'autres comme S11, IOEB 0607 ou CH35 sont plus éloignées, ce qui implique un échange par des événements de transferts horizontaux.

Les plasmides de type " pOENI-1 " semblent également soumis à de nombreux événements de recombinaison. En effet, des séquences plasmidiques partielles de type pOENI-1 ont été détectées chez 14 autres souches d'*O. oeni*. Ces séquences sont de taille et de contenu variable selon les souches et sont probablement insérées sur le chromosome



comme c'est le cas pour la souche ATCC BAA 1163. D'un point de vue phylogénétique, ces souches sont souvent très proches d'une autre contenant un plasmide. L'insertion chromosomique de certaines séquences plasmidiques pourrait stabiliser des gènes d'intérêt potentiel pour la cellule. Nous notons qu'aucune des souches du groupe génétique B ne présente ce type de plasmides ou les gènes associés, à l'exception de ATCC BAA 1163. Cette observation est en accord avec le fait que les populations A et B d'*O. oeni* évoluent séparément et que le groupe B présente un faible contenu en éléments mobiles (Bridier *et al.*, 2010 ; El Gharniti *et al.*, 2012).

### **7.3. Prédominance des plasmides chez les levains malolactiques et les souches indigènes menant la FML**

L'analyse de 59 souches d'*O. oeni* a révélé que 9 d'entre elles contenaient un plasmide de type pOENI-1 : 5 levains malolactiques (CH35, EQ54, L31, VF, VP41) et 4 autres (S11, IOEB 0607, AWRIB568, AWRIB576). La fréquence du plasmide apparaît élevée chez les levains malolactiques (33%, 5/15), par comparaison aux autres souches où seulement 8,8% le contiennent. Quatorze souches supplémentaires portent aussi une séquence plasmidique contenant les gènes *tauE* et/ou *oye* sur d'autres locus génomiques. Parmi elles, trois autres levains (B16, BL01, 450 Preac) semblent présenter une insertion chromosomique d'une large région du plasmide pOENI-1 contenant le gène *tauE*. Les résultats montrent également que les plasmides de type pOENI-1 ainsi que les gènes associés sont fréquents chez les bactéries indigènes responsables de la FML. En effet, les gènes *tauE* et *oye* ont été détectés dans l'ensemble des 95 échantillons analysés et sont particulièrement abondants dans les échantillons prélevés au cours de la FML, atteignant souvent le même niveau que la population bactérienne. D'après ces observations, la fréquence élevée des plasmides chez les levains malolactiques semble associée au fait que ces souches sont préférentiellement sélectionnées lors de FML spontanées.

Il est très peu probable que les gènes codés par le plasmide confèrent à eux seuls la capacité à survivre dans le vin et à mener la FML. Le vin est un environnement complexe et contraignant pour la plupart des micro-organismes (Fleet *et al.*, 1984 ; Renouf *et al.*, 2007). La capacité des bactéries à survivre dans le vin et à mener efficacement la FML implique de



nombreux gènes, dont plusieurs ont déjà été décrits (Jobin *et al.*, 1999 ; Bourdineaud *et al.*, 2003 ; Beltramo *et al.*, 2004 ; Bourdineaud *et al.*, 2004 ; Bartowsky, 2005 ; Coucheney *et al.*, 2005 ; Grandvalet *et al.*, 2005 ; Grandvalet *et al.*, 2008 ; Weidmann *et al.*, 2010). Cependant, la prédominance des plasmides de la famille " pOENI-1 " et des gènes associés chez les levains malolactiques et les bactéries indigènes rencontrées au cours de la FML suggère qu'ils contribuent positivement à l'adaptation de ces bactéries au cours de la vinification.

#### 7.4. Rôle potentiel des plasmides de la famille " pOENI-1 "

De précédentes études ont soulevé l'importance des plasmides chez les bactéries lactiques industrielles, notamment dans l'industrie laitière. En effet, ils codent de nombreuses propriétés essentielles dans l'adaptation des souches aux environnements laitiers (fermentation du lactose, dégradation des caséines, résistance aux bactériophages) qui sont à l'origine de leur supériorité technologique (Siezen *et al.*, 2005 ; Mills *et al.*, 2006). D'ailleurs certains plasmides de bactéries lactiques, qui ont des similarités de séquence avec les plasmides de la famille " pOENI-1 ", codent des fonctions d'intérêt comme la production et la résistance à une bactériocine (pLgAL39, *Lactobacillus gasserii*) (Ito *et al.*, 2009), le transport d'acides aminés et composés carbonés (plca36, *Lactobacillus casei*) (Zhang *et al.*, 2008) ou la résistance aux bactériophages (pH10, *Lactobacillus helveticus* ; pPECL-8, *Pediococcus claussenii*) (Zhao *et al.*, 2011 ; Pittet *et al.*, 2012). Les ORFs accessoires, au nombre de sept (ORFs 2, 5, 6 et 16 à 19), détectées sur pOENI-1 et pOENI-1v2 pourraient être bénéfiques à la cellule hôte, mais une fonction protéique a seulement été prédite pour deux d'entre elles (*tauE* et *oye*).

La protéine TauE appartient à une famille de transporteurs impliqués dans l'import/export des sulfites libres ou combinés (pfam01925). Ces protéines membranaires participent à l'assimilation des composés soufrés par les bactéries *Corynebacterium glutamicum* et *Comamonas testosteroni* (Mampel *et al.*, 2004 ; Ruckert *et al.*, 2005), alors que chez les protéobactéries *Cupriavidus necator* et *Neptuniibacter caesariensis*, les protéines de la famille TauE ont été identifiées comme des exporteurs de sulfites ou d'acide sulfoacétique ; des molécules produites au cours du métabolisme de la taurine (Weinitschke *et al.*, 2007 ; Krejčík *et al.*, 2008). Nous pouvons imaginer que la protéine TauE a une



fonction d'export chez *O. oeni*, car les sulfites sont systématiquement présents dans le vin, que ce soit suite à leur ajout par le vinificateur ou à leur production par les levures. Il est bien connu que de fortes concentrations de sulfites dans le vin empêchent le développement des bactéries et le déroulement de la FML (Carreté *et al.*, 2002). La protéine TauE pourrait donc conférer un avantage aux souches d'*O. oeni* qui la possèdent.

La protéine Oye, détectée sur les plasmides d'*O. oeni*, pourrait aussi être avantageuse pour les bactéries du vin. Le rôle physiologique des " Old Yellow Enzymes " est encore largement méconnu, mais elles semblent intervenir dans diverses fonctions biologiques incluant la réponse au stress (Blehert *et al.*, 1999 ; Fitzpatrick *et al.*, 2003 ; Williams *et al.*, 2004 ; Reekmans *et al.*, 2005 ; Brige *et al.*, 2006 ; Trotter *et al.*, 2006 ; Farah and Amberg, 2007 ; Odat *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2008). Ces enzymes n'ont pas encore été caractérisées chez les bactéries lactiques, mais identifiées chez *Bacillus subtilis* où elles sont exprimées en réponse à un stress oxydatif et à une acidification intracellulaire (Fitzpatrick *et al.*, 2003 ; Kitko *et al.*, 2009).

Bien que les fonctions prédites pour TauE et Oye semblent utiles pour les souches d'*O. oeni* qui réalisent la FML, l'analyse physiologique des souches hôtes VF et VP41, et de leurs souches isogéniques, VF- et VP41-, dépourvues de pOENI-1 et pOENI-1v2, respectivement, n'a pas révélé de différences évidentes en présence de divers facteurs de stress ou au cours des fermentations. De façon répétée, la souche VF portant le plasmide pOENI-1 a terminé la FML quelques jours avant (2 à 14 jours) la souche VF- ; mais ce résultat n'a pas été confirmé chez les souches VP41+ et VP41-. Au laboratoire, la stabilité des plasmides dépend de nombreux facteurs (Friehs, 2004) et leur étude fonctionnelle devient complexe, ce qui explique probablement la difficulté à reproduire certains résultats. Par conséquent, il est encore difficile de savoir si les plasmides de type pOENI-1 confèrent un avantage essentiel dans l'adaptation des souches au milieu " vin " et un intérêt technologique aux souches qui les portent. Pour déterminer l'éventuel rôle fonctionnel conféré par les plasmides de type pOENI-1, il sera nécessaire de préciser les fonctions des protéines TauE et Oye, mais aussi celui des protéines " hypothétiques " codées par ces plasmides, et d'analyser l'expression de leurs gènes.



## **CHAPITRE 2**

**Recherche de gènes d'intérêt technologique  
chez *O. oeni* : étude des génomes.**

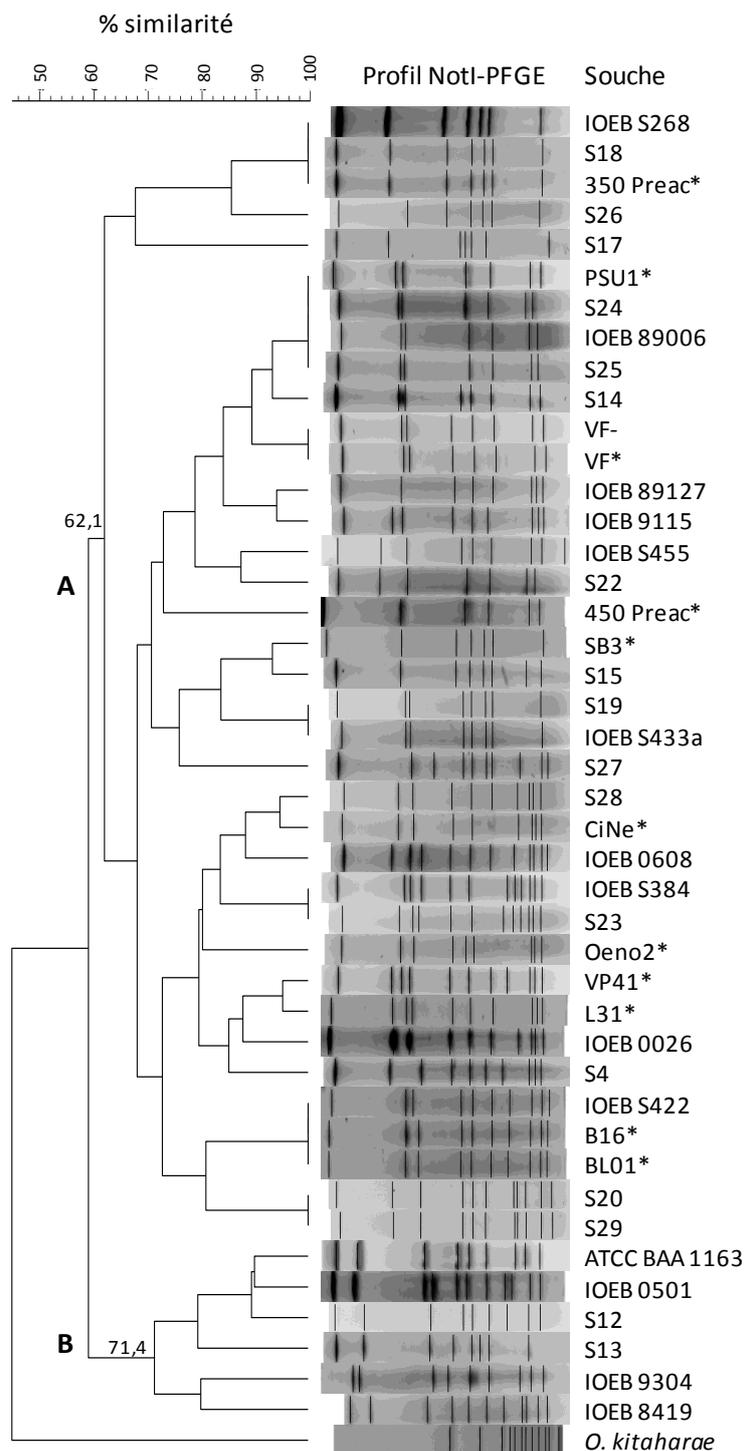


# 1. Caractérisation phénotypique de 44 souches d'*O. oeni*

## 1.1. Sélection des souches

L'objectif des travaux a été d'analyser une collection de souches d'*O. oeni* par deux approches : phénotypique et génomique, puis d'établir des corrélations entre les données obtenues, afin d'identifier les gènes impliqués dans les propriétés d'intérêt technologique, en particulier la capacité de survie dans le vin et la capacité à réaliser la FML. Afin d'établir une collection aux caractéristiques génétiques et aux propriétés technologiques connues, 44 souches d'*O. oeni* ont été choisies selon différents critères (origine, groupe génétique, disponibilité des séquences génomiques, intérêt industriel) (Matériels et méthodes, Tableau 2). La collection se compose de 11 levains malolactiques couramment utilisés en France ou à l'international, 14 souches de la collection de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (IOEB), 1 souche de l'American Type Culture Collection (ATCC) et 18 nouveaux isolats déposés dans la collection SARCO.

La plupart des souches étaient déjà disponibles au laboratoire sous forme congelée ou lyophilisée et avaient été isolées à partir de vins rouges, vins blancs ou cidre ; elles proviennent de différentes régions de France mais aussi de Californie et d'Italie. Les 18 nouveaux isolats ont été récoltés au cours de cette étude lors des campagnes de vinification 2008/2009 dans l'objectif de rechercher de nouvelles souches d'intérêt industriel pour la société LAFFORT (Résultat et discussion, Chapitre 3). Pour cela, 34 vins dont la plupart présentait des FML spontanées réalisées dans des conditions particulières de pH, température, éthanol ou SO<sub>2</sub> ont été analysés. Les bactéries lactiques ont été isolées sur milieu " jus de raisin " sélectif, 43 colonies représentant les différents morphotypes recueillis sur boîte ont été repiquées puis caractérisées par PCR spécifique de l'espèce *O. oeni* (OO1-OO2, Divol *et al.*, 2003), ce qui a permis d'identifier 20 *O. oeni*. Une première discrimination par PCR RAPD multiplex Coc-On2 (Reguant and Bordons, 2003) a été réalisée afin de rejeter les clones identiques d'un même échantillon, soit 2 sur les 20 *O. oeni*. Les 18 nouveaux isolats de la collection SARCO proviennent chacun d'un échantillon de vins différents (vins rouges, blancs ou pétillants) collectés dans 11 propriétés de France mais aussi d'Angleterre.



**Figure 38. Typage des 44 souches d'*O. oeni* par NotI-PFGE.** Le dendrogramme UPGMA a été construit à partir des profils de restriction NotI-PFGE, à l'exception de la souche S11 pour laquelle aucun profil n'a pu être obtenu par l'enzyme de restriction NotI. Une analyse MLST a permis de la positionner à proximité des souches B16, BL01 et IOEB S422. Au sein des deux groupes A et B, les profils présentent 62,1% et 71,4% de similarité, respectivement. Le profil NotI-PFGE de la souche DSM 17330 d'*O. kitaharae* a été utilisé pour enraciner le dendrogramme. Astérisque, levains maloactiques.

## 1.2. Typage génétique des souches

Les 44 souches d'*O. oeni* ont été typées par la technique REA-PFGE. Cette méthode est basée sur la digestion des génomes par des enzymes de restriction à site rare (ici, NotI) suivie d'une électrophorèse en champs pulsé. La diversité des profils obtenus reflète essentiellement des variations génomiques importantes résultant de réarrangement du chromosome, d'insertions/délétions de séquences (prophages, îlots génomiques) ou encore de la présence d'éléments extrachromosomiques (plasmides, bactériophages). Un dendrogramme a été généré à partir des profils de restriction par NotI en utilisant la méthode UPGMA (Figure 38). Il a permis de discriminer les souches et de déterminer leur groupe génétique. Les 44 souches se répartissent dans deux sous-populations génétiques, A et B, comme précédemment décrit (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010). Trente huit souches, comprenant les 11 levains malolactiques, appartiennent au groupe A, et 6 au groupe B, soit 87% et 13% de la collection, respectivement. La répartition des souches au sein des sous-populations n'est pas uniforme et se rapproche plutôt du rapport 70% - 30% déjà décrit entre A et B pour une collection de plus de 250 souches (Bridier, 2011). Malgré de nombreux essais, aucun profil de restriction NotI n'a pu être obtenu pour la souche S11. Il est possible que son ADN soit protégé par une certaine forme de méthylation empêchant l'activité endonucléasique de l'enzyme. Cette souche a donc été typée par MLST, ce qui a permis de la positionner dans le groupe A, à proximité des souches B16, BL01 et IOEB S422 (Résultats et discussion, Chapitre 1, Figure 28).

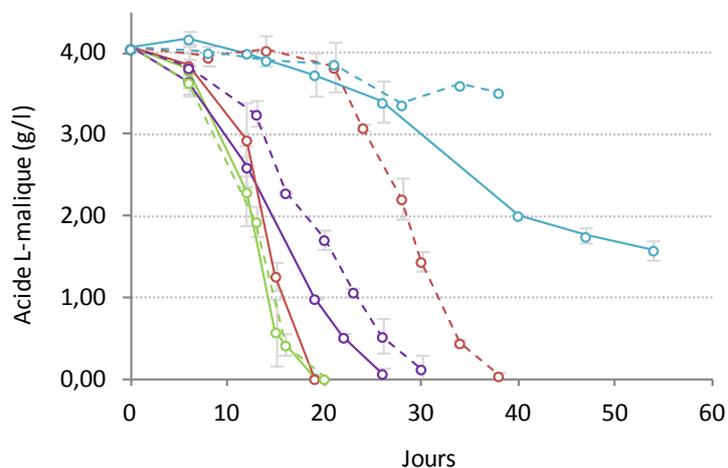
L'analyse des profils de digestion NotI-PFGE a révélé 32 génotypes différents (Figure 38). Vingt cinq sont spécifiques d'une seule souche, ce qui correspond à une discrimination de 58% des souches. D'autres outils de typage moléculaire ont été testés pour tenter de différencier les 18 autres souches. Ainsi, 8 d'entre elles ont pu être discriminées et considérées comme des souches uniques au sein de la collection grâce aux techniques Apal-PFGE (S23 et IOEB S384), Sfil-PFGE (IOEB S268, PSU-1 et IOEB 89006) et MLST (B16, BL01 et IOEB S422). Comme décrit précédemment dans le chapitre 1 des résultats, la présence du plasmide pOENI-1 est le seul élément permettant de différencier les souches VF+ et VF-. Les isolats S18 et 350 Preac, S19 et IOEB S433a, S20 et S29, S24 et S25 ont des profils de restriction identiques pour les trois enzymes testées NotI, Apal, Sfil et n'ont pu être



comparés par MLST (données non disponibles). Malgré leurs origines éloignées, les isolats S19 et IOEB S433a (Pessac-Léognan, 2009 et Cahors, 2002), S24 et S25 (Angleterre, France : Saint Emilion) présentent les mêmes génotypes et semblent appartenir à la même souche, comme S20 et S29 qui, elles, proviennent d'une même cave. Pour le cas S18 et 350 Preac, il est probable que l'isolat S18 ait été récolté dans un château où la souche commerciale 350 Preac ait été propagée et ensemencée dans les vins via le matériel de vinification. Ainsi, la collection se compose d'au moins 40 souches différentes, dont 4 sont probablement représentées par deux isolats. Dans la suite des travaux, les 44 individus ont été caractérisés selon leurs phénotypes d'intérêt technologique. Pour plus de clarté, nous les décrivons comme 44 souches dans la suite des travaux.

### 1.3. Elaboration d'un protocole de caractérisation technologique

Un protocole de caractérisation phénotypique des souches a été élaboré. L'objectif était d'évaluer les propriétés indispensables aux levains malolactiques, que ce soit au moment de leur utilisation dans le vin (survie à l'inoculation, cinétique de fermentation) ou au cours de leur production (rendement de production, résistance à la lyophilisation). Les différentes étapes du protocole ont été définies dans le but d'observer et comparer les propriétés technologiques de chaque souche. Contrairement aux procédures utilisées classiquement par d'autres auteurs pour sélectionner des souches d'*O. oeni* (Torriani *et al.*, 2010), nous avons choisi de commencer par lyophiliser les souches selon un protocole de lyophilisation comparable à celui utilisé dans l'industrie, mais adapté aux volumes traités au laboratoire. Il nous a semblé que les tests phénotypiques réalisés pour comparer les propriétés technologiques des souches seraient plus proches de la réalité s'ils étaient réalisés avec des souches lyophilisées, comme le sont les levains malolactiques, plutôt qu'avec des souches produites dans un milieu de laboratoire. Après lyophilisation, chaque souche a été testée dans un vin modèle que nous avons produit à partir de jus de raisin rouge commercial (pH 3,6, TAV 12%, acide L-malique 4g/l) (Matériels et méthodes, paragraphe 3.2.1). Les 44 souches d'*O. oeni* ont ainsi été décrites selon leur rendement de production, leur survie à l'inoculation dans le vin et leurs capacités à mener la FML. La dégradation d'acide citrique et la production d'acide acétique ont également été mesurées.



**Figure 39. Comparaison d'essais de FML en inoculation directe ou après acclimatation.** Les souches S11 (vert), S14 (violet), 350 Preac (rouge) et IOEB S433a (bleu) produites sous la forme de lyophilisats ont été réhydratées 15 minutes dans de l'eau distillée stérile (ligne continue) ou acclimatées (ligne discontinue) 12h à 20°C dans le vin modèle dilué au demi et supplémenté avec des extraits de levures avant d'être inoculées dans le vin rouge modèle (pH 3,6, 12% éthanol, 4g/l acide L-malique) à  $10^7$  cellules/ml. La dégradation de l'acide malique a été suivie 2 fois par semaine par dosage enzymatique. Chaque essai a été réalisé en duplicata.

Pour tester le comportement des souches lyophilisées dans le vin, nous avons choisi le mode d'inoculation directe, après réhydratation des lyophilisats dans l'eau, plutôt que d'ajouter une étape d'acclimatation au vin de plusieurs heures. En effet, des auteurs ont suggéré que lorsque les lyophilisats sont acclimatés avant d'être introduits dans le vin, les performances des souches sont nettement améliorées (Cecconi *et al.*, 2009). Nous avons pu le vérifier lors d'essais préliminaires au cours desquels nous avons comparé le comportement des souches S11, S14, IOEB S433a et 350 Preac en réalisant des inoculations directes ou après acclimatation (Figure 39). Les cinétiques de dégradation de l'acide L-malique ont été suivies et nous avons noté une amélioration des cinétiques fermentaires de la plupart des souches (réduction de 4 jours pour S14, de 19 jours pour 350 Preac et début de FML à 20 jours pour IOEB S433a), et une diminution de la variabilité observée. Pour s'assurer que la majorité des souches présenterait un taux de survie, après inoculation directe dans le vin, qui soit compatible avec le déclenchement de la FML ( $>10^6$  cellules/ml), nous avons choisi de les inoculer à  $10^7$  cellules/ml au lieu des  $1 \times 10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml préconisés dans la pratique.

Les phénotypes d'intérêt technologique de chacune des 44 souches d'*O. oeni* typées par REA-PFGE ont été déterminés selon le protocole ci-dessus, élaboré pour mimer les conditions industrielles et œnologiques. Ainsi, le rendement de production, la survie dans le vin et les capacités fermentaires des souches ont été évalués et un classement des unes par rapport aux autres a été établi. Pour chaque paramètre, nous nous sommes intéressés à comparer les 11 souches commerciales (levains malolactiques) et les 33 souches non commerciales comprenant les 18 nouveaux isolats et 15 souches dites de "laboratoire".

## **1.4. Détermination des phénotypes d'intérêt technologique**

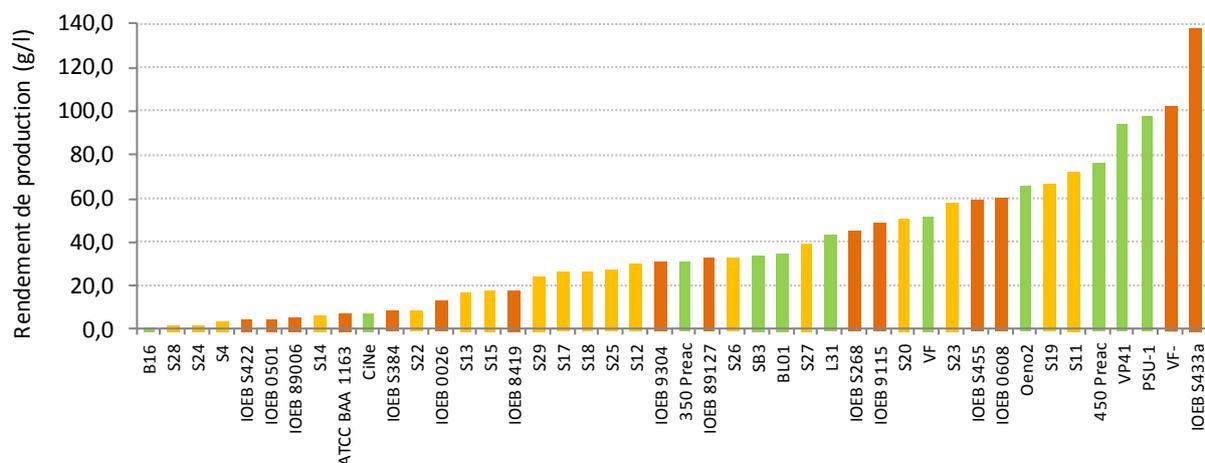
### **1.4.1. Rendement de production sous forme lyophilisée**

La congélation-lyophilisation est le processus le plus répandu pour la production industrielle des levains malolactiques car il facilite la manipulation, la conservation et le stockage des bactéries. Cependant, cette étape est délicate, car elle affecte directement l'état physiologique et les qualités technologiques des bactéries (Coulilaby *et al.*, 2011). Pour ces raisons, nous avons choisi de produire les souches d'*O. oeni* sous forme lyophilisée,

**Tableau 13. Paramètres de production des 44 souches d'*O. oeni* sous forme lyophilisée.**

	Culture finale		Lyophilisat		
	pH	Population <sup>a</sup> ( $\times 10^9$ cellules/ml)	Masse du lyophilisat (g)	Population viable <sup>b</sup> ( $\times 10^{12}$ cellules/g)	Rendement de production (g/l)
Toutes les souches	3,75 $\pm$ 0,22	4,3 $\pm$ 1,4	2,55 $\pm$ 0,38	1,4 $\pm$ 1,2	36,7 $\pm$ 30,9
Souches commerciales	3,79 $\pm$ 0,30	4,5 $\pm$ 1,2	2,50 $\pm$ 0,44	1,8 $\pm$ 1,2	48,6 $\pm$ 31,9
Souches non commerciales	3,72 $\pm$ 0,18	4,2 $\pm$ 1,5	2,57 $\pm$ 0,39	1,3 $\pm$ 1,2	33,0 $\pm$ 30,8

Moyenne  $\pm$  écart-type ; a, population estimée par densité optique ; b, population estimée par épifluorescence.

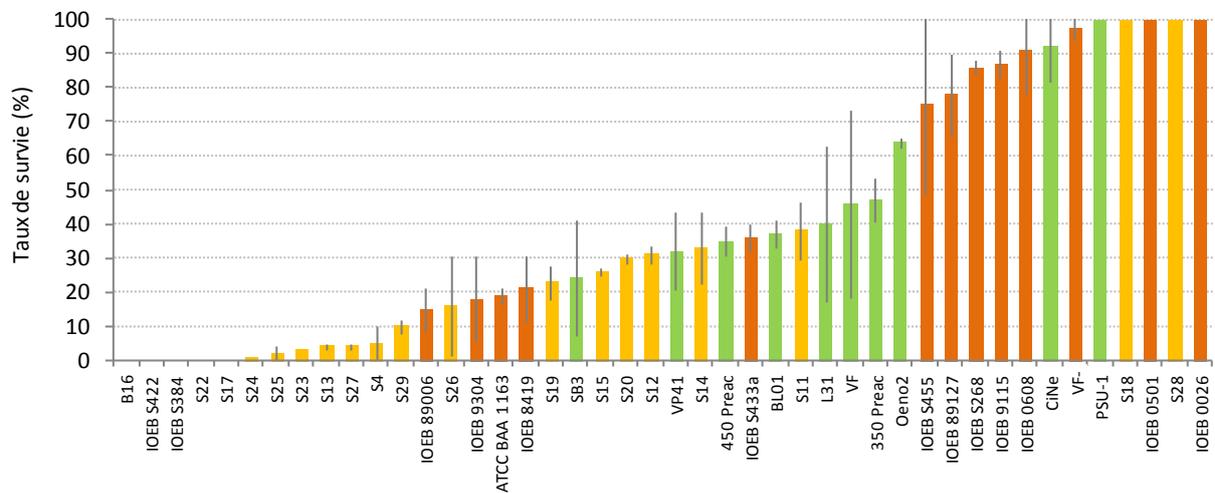


**Figure 40. Rendement de production des 44 souches d'*O. oeni*.** Le rendement de production correspond à la masse de lyophilisat ramenée à la concentration usuelle de  $10^{11}$  cell/g produite par litre de production. Sa mesure dépend de la masse de lyophilisat obtenue et de la population viable mesurée par épifluorescence. Les souches commerciales (vert), les nouveaux isolats (orange clair) et les souches de "laboratoire" (orange foncé) sont représentées. Les résultats indiqués correspondent à une seule répétition.

d'évaluer leur comportement au cours du processus et de calculer leur rendement de production.

Après un enrichissement de la biomasse bactérienne par fed-batch durant 6 jours en milieu de production " jus de pomme ", les cellules ont été récoltées par centrifugation. Au cours de la production des cellules, l'acidification du milieu de culture et la biomasse bactérienne obtenue ont été relativement constantes pour toutes les souches (Tableau 13). Quelques exceptions ont tout de même été notées. Elles concernent les souches IOEB S384, IOEB S422, IOEB 89006, S22 et 450 Preac, pour lesquelles 1 à 2 jours d'incubation supplémentaires ont été nécessaires pour atteindre un pH inférieur à 3,9 critère de confirmation du développement cellulaire dans le protocole industriel. Pour certaines souches (ATCC BAA 1163, B16, IOEB 9304), nous avons observé des difficultés de sédimentation lors des centrifugations, liées probablement à la production d'exopolysaccharides qui pourraient augmenter la viscosité du milieu. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été lavés et concentrés 50 fois dans de l'eau physiologique, puis un cryoprotecteur à base de gélatine (Gecoll®, LAFFORT) a été additionné aux sédiments à 40% (p/p). Les suspensions cellulaires ont ensuite été congelées à -80°C pendant une nuit, puis lyophilisées pendant 24h. Les lyophilisats obtenus ont été broyés stérilement, pesés, et la population de cellules viables a été déterminée par microscopie à épifluorescence. Pour un litre de culture cellulaire initiale, il a été obtenu en moyenne 2,55 grammes de lyophilisat, avec une faible variabilité entre les 44 souches (Tableau 13). Par contre, une variabilité plus importante a été notée concernant les populations viables dénombrées dans les lyophilisats. En effet, celles-ci étaient comprises entre  $2,5 \times 10^{10}$  (B16) et  $5,2 \times 10^{12}$  (IOEB S433a) cellules/g.

L'ensemble des données obtenues suggère qu'il existe une mortalité cellulaire qui est liée à l'étape de congélation-lyophilisation et qui est variable selon les souches. Cette mortalité est le principal facteur dont dépend le rendement de production (Tableau 13 et Figure 40). En effet, il est directement corrélé à la population de cellules viables (Spearman,  $\rho = 0,992$  ;  $p\_value < 0,001$ ) et non à la masse des lyophilisats. Comme attendu, des rendements très variables ( $36,7 \pm 30,9$  g/l) ont été obtenus, aussi bien pour les levains malolactiques, que pour les souches non commerciales (Figure 40). Malgré cette variabilité, on note un rendement de production moyen plus élevé chez les levains malolactiques. Les

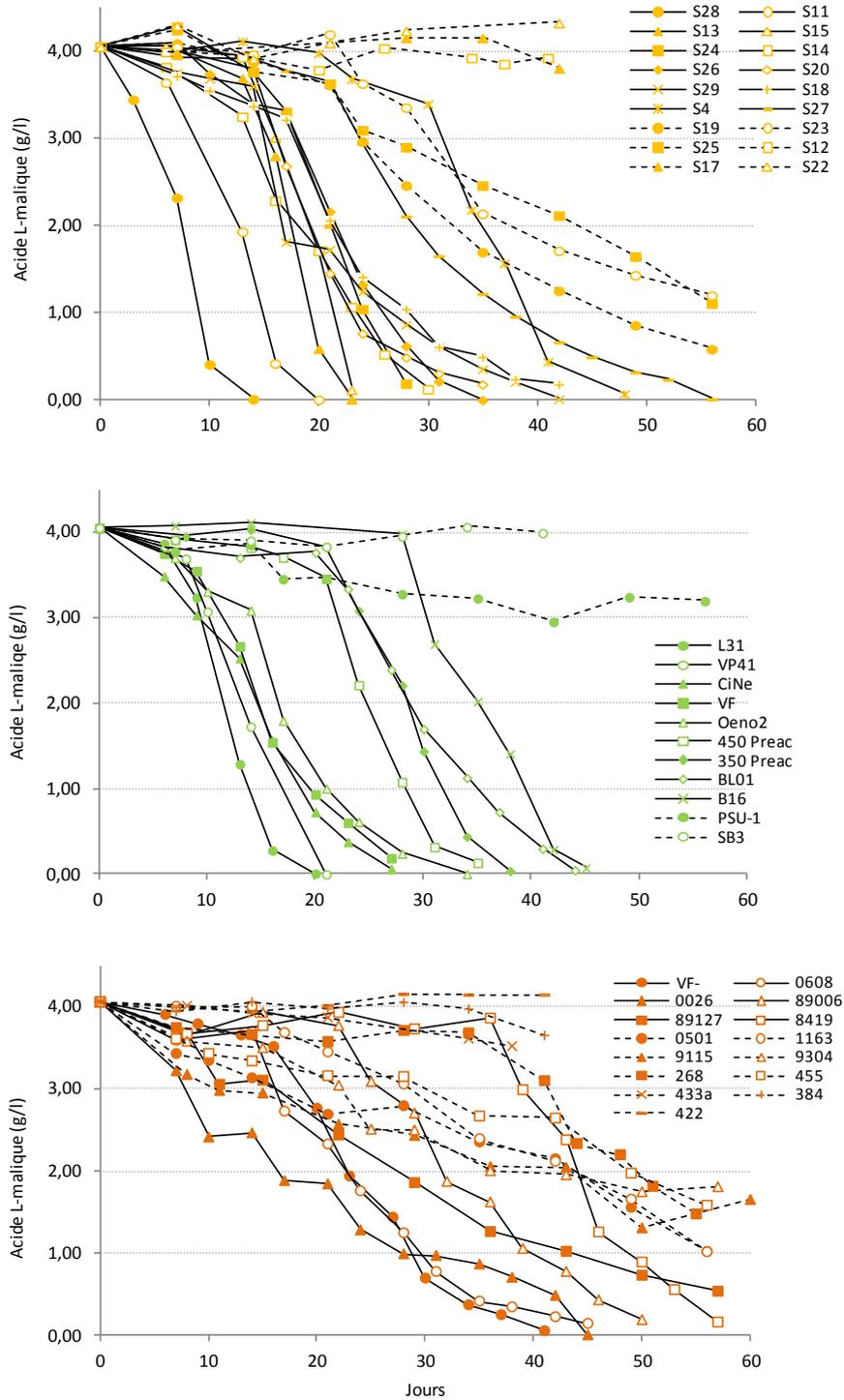


**Figure 41. Taux de survie à l'inoculation dans le vin des 44 souches d'*O. oeni*.** Après réhydratation des lyophilisats 15 min dans de l'eau, les souches ont été inoculées à  $10^7$  cellules/ml dans le vin modèle incubé à 20°C. La population viable 24h après l'inoculation a été déterminée par épifluorescence. Les souches commerciales (vert), les nouveaux isolats (orange clair) et les souches de laboratoire (orange foncé) sont représentées. Chaque essai a été réalisé en duplicata.

souches pour lesquelles une incubation plus longue a été nécessaire lors de la production de biomasse (IOEB S384, IOEB S422, IOEB 89006, S22 et 450 Preac) ou pour lesquelles des difficultés de sédimentation ont été observées lors des étapes de centrifugation (ATCC BAA 1163, B16, IOEB 9304) ont par conséquent des rendements de production faibles - inférieurs à 10 g/l - à l'exception des souches IOEB 9304 et 450 Preac (30,6 et 75,5 g/l).

#### 1.4.2. Survie à l'inoculation

Après la lyophilisation, l'inoculation dans le vin est la seconde étape critique qui peut affecter la survie cellulaire et le bon déroulement de la FML. Nous avons étudié la capacité des souches d'*O. oeni* à survivre dans le vin suite à une inoculation directe. Les 44 souches produites sous forme lyophilisée ont été réhydratées pendant 15 min dans de l'eau distillée, puis ensemencées à  $10^7$  cellules/ml dans le vin modèle. Le taux de survie de chacune a été déterminé 24h après l'inoculation, par dénombrement des cellules viables au microscope à épifluorescence (Figure 41). Ce taux de survie est très variable selon les souches ; il varie de moins de 1% (S17, S22, IOEB S384, IOEB S422 et B16) jusqu'à 100% ou plus (S18, S28, IOEB 0026, IOEB 0501, CiNe, PSU-1 et VF-). Pour 11 souches, l'inoculation dans le vin a provoqué une diminution drastique de la population viable qui a chuté à moins de 10%. Parmi ces souches figurent notamment 8 nouveaux isolats et la souche commerciale B16 qui est préconisée pour une inoculation " par pied de cuve ", nécessitant une phase d'acclimatation d'au moins 4 jours. Dans une autre étude, la souche B16 a également présenté des difficultés à survivre après l'inoculation dans un vin blanc à pH 3,0 et riche en acides gras et n'a pas mené la FML (Renouf and Favier, 2010). Au contraire, certaines souches ont particulièrement bien résisté à l'inoculation et se sont probablement développées pendant les 24 heures de l'essai, puisque leur taux de survie est proche de 100% ou supérieur à cette valeur. De façon étonnante, le taux de survie moyen des nouveaux isolats (24%) est relativement faible par comparaison à ceux des souches de " laboratoire " et des levains malolactiques (55% et 47%, respectivement).



**Figure 42. Cinétiques fermentaires des 44 souches d'*O. oeni*.** Après inoculation des souches lyophilisées dans le vin modèle ( $10^7$  cellules/ml), la dégradation de l'acide L-malique a été suivie deux fois par semaine durant 8 semaines, à l'exception des FML qui n'ont pas débuté après 6 semaines. Les cinétiques des souches commerciales (vert), des nouveaux isolats (orange clair) et des souches de "laboratoire" (orange foncé) sont représentées. Les essais de microvinification ont été menés en duplicata, les écarts-types sont compris entre 0,01 et 0,5 g/l.

### 1.4.3. Capacités fermentaires

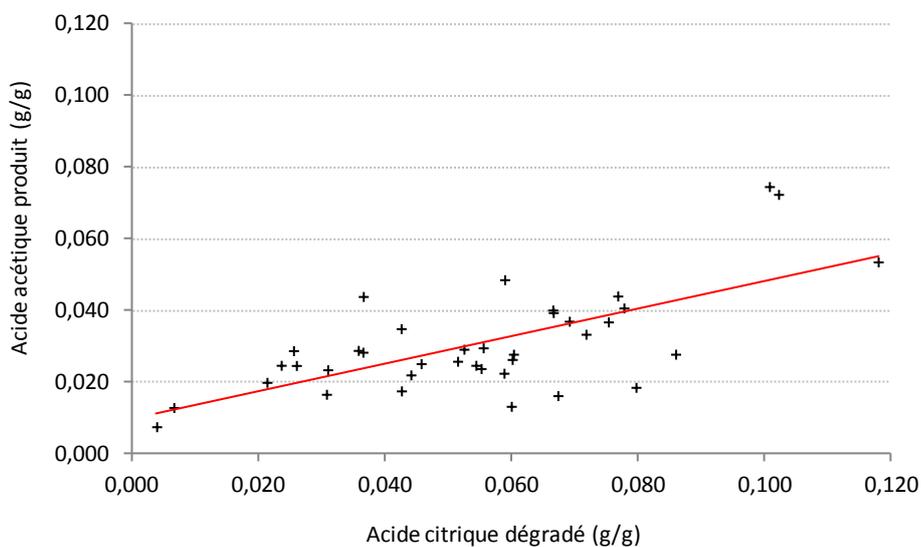
Une des principales propriétés recherchées chez les levains malolactiques est leur capacité à réaliser la FML complètement et rapidement. Nous avons mesuré cette capacité pour les 44 souches lyophilisées en les inoculant dans le vin modèle. Après l'inoculation des lyophilisats à  $10^7$  cellules/ml, la dégradation de l'acide L-malique a été suivie deux fois par semaine jusqu'à ce que la teneur en acide L-malique soit inférieure à 0,2 g/l. Nous avons ainsi déterminé la durée totale de la FML (depuis l'inoculation jusqu'à la fin de la FML), la durée de la phase de latence (depuis l'inoculation jusqu'au début de la dégradation de l'acide L-malique) et la durée de la FML active (du début de la dégradation de l'acide L-malique jusqu'à la fin de la FML). Selon une étude de corrélation, la durée totale de la FML est étroitement liée à la FML active ( $\rho = 0,906$  ;  $p\_value < 0,001$ ) et dans une moindre mesure à la phase de latence, qui dépend elle-même du taux de survie après inoculation (Tableau 14, page suivante).

Quelque soit le groupe de souches considéré, une grande variabilité des cinétiques de fermentation a été observée (Figure 42). Sept souches n'ont pas débuté la FML 42 jours après l'inoculation. Parmi celles-ci, figurent les souches IOEB S384, IOEB S422, S17 et S22, sensibles à l'inoculation dans le vin avec un taux de survie inférieur à 1% mais aussi le levain SB3 et deux autres souches de "laboratoire" aux capacités de survie moyennes. Pour ces dernières, la population viable a probablement continué à décliner après l'analyse à 24h. La souche commerciale PSU-1 a également montré une cinétique fermentaire très médiocre. Malgré un taux de survie supérieur à 100% et un début de FML après 18 jours de phase de latence, un arrêt de fermentation a été observé après 28 jours alors que le vin contenait encore 3,2 g/l d'acide L-malique. En accord avec ces résultats, PSU-1 a été décrite comme une souche ayant des difficultés à se développer au cours de la FML et présentant des cinétiques fermentaires lentes (Olguín *et al.*, 2010). Les 36 autres souches de la collection ont été capables de dégrader l'acide L-malique plus ou moins rapidement : de 14 à plus de 100 jours (Figure 42). Les durées de phase de latence et de FML active s'étendent, respectivement, de moins de 3 à 36 jours, et de 10 à plus de 200 jours (durée extrapolée). Certaines souches ont présenté de réelles qualités fermentaires (FML < 30 jours) associant une phase de latence et une FML active courtes (< 14 jours). C'est le cas par exemple des isolats S11, S13, S15, S28 et des souches commerciales L31 et VP41. Même des souches

**Tableau 14. Table des corrélations  $\rho$  de Spearman.**

	Production	Survie	Latence	FML active	FML totale	Ac.citrique	Ac.acétique
Production	1,000	0,364	0,017	0,131	0,054	-0,012	0,073
Survie	0,364	1,000	<b>-0,547</b>	0,158	-0,050	-0,076	0,032
Latence	0,017	<b>-0,547</b>	1,000	0,150	<b>0,441</b>	-0,059	-0,040
FML active	0,131	0,158	0,150	1,000	<b>0,906</b>	-0,006	0,211
FML totale	0,054	-0,050	<b>0,441</b>	<b>0,906</b>	1,000	-0,016	0,241
Ac.citrique	-0,012	-0,076	-0,059	-0,006	-0,016	1,000	<b>0,619</b>
Ac.acétique	0,073	0,032	-0,040	0,211	0,241	<b>0,619</b>	1,000

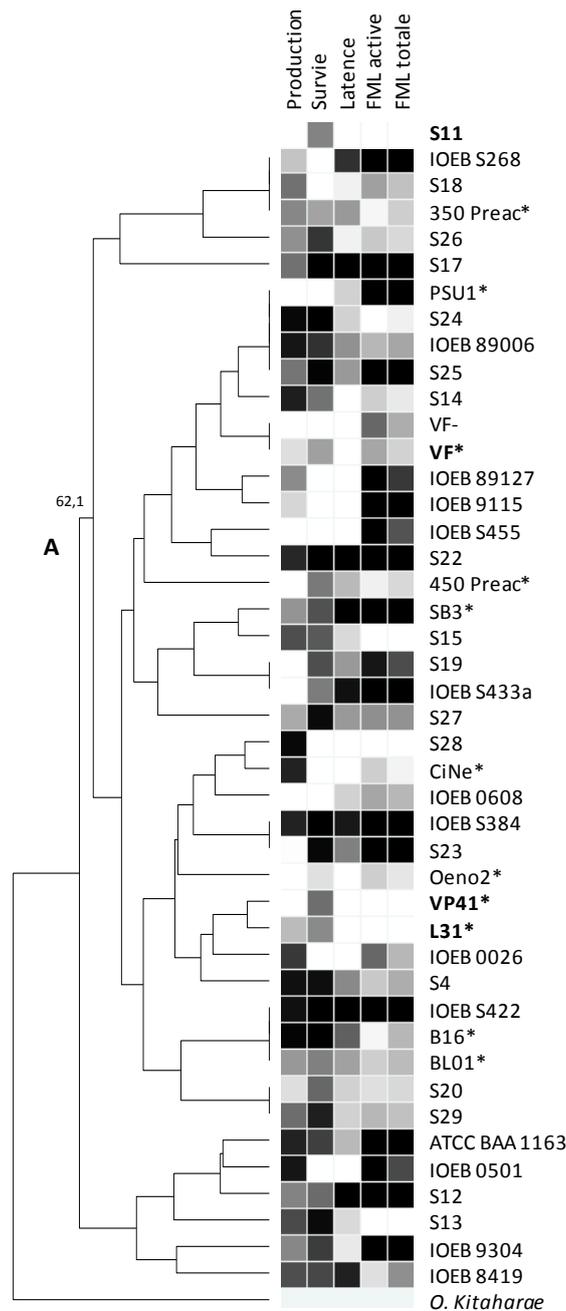
Rouge, p\_value < 0,001 ; vert, p\_value < 0,01.



**Figure 43. Corrélation entre la dégradation de l'acide citrique et la production d'acide acétique.** Les quantités d'acide citrique consommé et d'acide acétique produit sont exprimées par gramme d'acide L-malique dégradé. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes des essais de microvinification menés en duplicata, les écarts-types sont inférieurs à 0,02 g/g.

comme S13 et S24, qui présentaient des taux de survie à l'inoculation inférieurs à 5%, ont achevé la FML en moins de 30 jours. A l'inverse, d'autres souches, et notamment celles dites " de laboratoire " ont montré des capacités fermentaires très médiocres. Aucune n'a terminé la FML en moins de 40 jours. La plupart de ces souches de " laboratoire ", qui avait pourtant des taux de survie à l'inoculation assez élevés, a présenté une cinétique fermentaire atypique avec une phase de latence courte et une FML active longue (Figure 42).

En parallèle des FML, nous nous sommes aussi intéressés à la capacité des souches à dégrader l'acide citrique et à produire l'acide acétique. Le métabolisme de l'acide citrique participe à la régulation du pH intracellulaire et mène à la production de composés organoleptiques participant à la complexité aromatique du vin, comme le diacétyl, mais aussi l'acide acétique qui affecte considérablement la qualité du vin (Lonvaud-Funel, 1999 ; Olguin *et al.*, 2009). La dégradation de l'acide citrique et la production d'acide acétique ont été mesurées à la fin de la FML, ou lors de l'arrêt des essais pour les souches n'ayant pas terminé la FML au bout de 8 semaines (Figure 43). Les résultats ont été exprimés par gramme d'acide L-malique dégradé. La corrélation entre ces deux variables indique que la plupart des souches ne produisent pas ou peu d'acide acétique à partir des sucres résiduels (Tableau 14). Toutes les souches de la collection ont été capables de consommer totalement ou partiellement l'acide citrique et de produire de l'acide acétique, initialement présents dans le vin modèle à 370 mg/l et 240 mg/l, respectivement ; à l'exception des souches IOEB 89006, CiNe et bien sûr celles n'ayant pas débuté la FML. Concernant le levain CiNe (" Citrate Negative "), ce résultat était attendu puisqu'elle est commercialisée principalement pour son incapacité à dégrader l'acide citrique. La souche IOEB 89006, qui a terminé la FML en 50 jours, semble également présenter cette caractéristique dans les conditions testées. De façon plus générale, nous avons observé, au sein de la collection, une dégradation partielle de l'acide citrique en fin de FML, en accord avec l'observation selon laquelle le métabolisme de l'acide citrique est séquentiel à celui de l'acide L-malique au cours de la FML (Bartowsky and Henschke, 2004).



**Figure 44. Profils phénotypiques des 44 souches d'*O. oeni* typées par NotI-PFGE.** Le dendrogramme UPGMA a été construit à partir des profils de restriction NotI de chaque souche. Un profil phénotypique basé sur les cinq variables d'intérêt technologique a été associé. Les valeurs classées selon leur intérêt technologique, du plus élevé au plus faible, a été représentée selon une échelle de gris, du blanc au noir respectivement. Ces classements ont été réalisés automatiquement par le logiciel Bionumerics 5.1. Seules les valeurs d'intérêt technologique (blanc) ont été fixées pour chaque variable : production, >60 g/l ; survie, >75% ; latence <7 jours ; FML active <14 jours ; FML totale <23 jours. La souche S11 sans profil NotI est présentée en haut du dendrogramme. Astérisque, levain malolactique ; en gras, souche portant un plasmide de la famille " pOENI-1 ".

## 1.5. Corrélation entre les phénotypes d'intérêt technologique et les groupes génétiques

Ce travail nous a permis de disposer d'une collection de 44 souches d'*O. oeni* décrites selon leurs profils génétiques et leurs propriétés technologiques. Grâce à l'ensemble des données, nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre les groupes génétiques A et B et les phénotypes d'intérêt technologique. Lors de précédents travaux, il a été noté que la quasi-totalité des levains malolactiques appartient au groupe A (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, les 11 levains de la collection se distribuent uniquement au sein du groupe A. De plus, nous notons que la majorité des souches du groupe B présentent des caractéristiques médiocres concernant le rendement de production, le taux de survie après inoculation dans le vin et plus particulièrement la durée de FML totale. A l'exception de la souche S13, les FML ont été souvent languissantes et se sont terminées en plus de 57 jours. Cependant les analyses statistiques réalisées malgré un nombre restreint de souches dans le groupe B, n'ont pas permis de mettre en évidence des corrélations significatives entre les groupes génétiques et les performances technologiques des souches. En effet, une grande hétérogénéité des profils phénotypiques est observé au sein des deux groupes génétiques A et B mais également à l'intérieur de sous-groupes (Figure 44). Ces résultats indiquent que la méthode de typage moléculaire par REA-PFGE basée sur la comparaison de génotypes ne permet pas d'expliquer la variabilité phénotypique de l'espèce *O. oeni*.

**Tableau 15. Caractéristiques des séquences génomiques des souches d'*O. oeni*.**

Souche	Couverture de séquençage	Longueur des lectures (pb)	Nombre de contigs	Plus grand contig (pb)	Plus petit contig (pb)	N50	Nombre de contigs >N50	Taille du génome	Nombre d'ORFs
S25	46	404	33	313040	104	140671	5	1741405	1799
SB3	15	407	70	152407	112	63100	9	1741509	1783
IOEB 9517	26	412	58	208736	147	86291	8	1744084	1812
1163 <sup>a</sup>	-	-	61	161067	721	61665	10	1748994	1831
PSU-1 <sup>b</sup>	-	-	1	1780517	1780517	1780517	1	1780517	1873
B16	66	385	47	317870	139	108273	6	1793680	1864
IOEB 0205	50	407	44	392456	121	157775	4	1795352	1862
S22	92	383	45	277792	114	141242	5	1810398	1864
IOEB 0608	55	361	43	248792	114	108677	6	1812847	1880
S13	18	407	68	263823	120	67856	8	1814692	1864
IOEB 0607	26	406	126	321752	129	140050	5	1815910	1858
IOEB 0502	44	405	40	259746	140	140250	5	1822410	1870
IOEB 0501	52	352	45	299562	100	162140	5	1827189	1889
IOEB 9304	21	356	144	149269	108	79430	9	1828690	1886
IOEB 9803	67	415	36	308185	332	146580	5	1833906	1893
IOEB 8417	19	408	65	179106	215	95439	7	1842137	1903
IOEB 9805	21	409	57	176132	249	138815	6	1843445	1899
S28	53	379	47	326379	146	90157	7	1843549	1916
VP41 <sup>c</sup>	-	-	58	203450	540	85101	8	1927702	2019
S11	34	384	186	228386	107	58933	11	1980667	2071
IOEB 9701	21	411	495	98086	103	24426	21	1996090	-
IOEB 9613	18	407	561	54575	103	15749	37	2055807	-

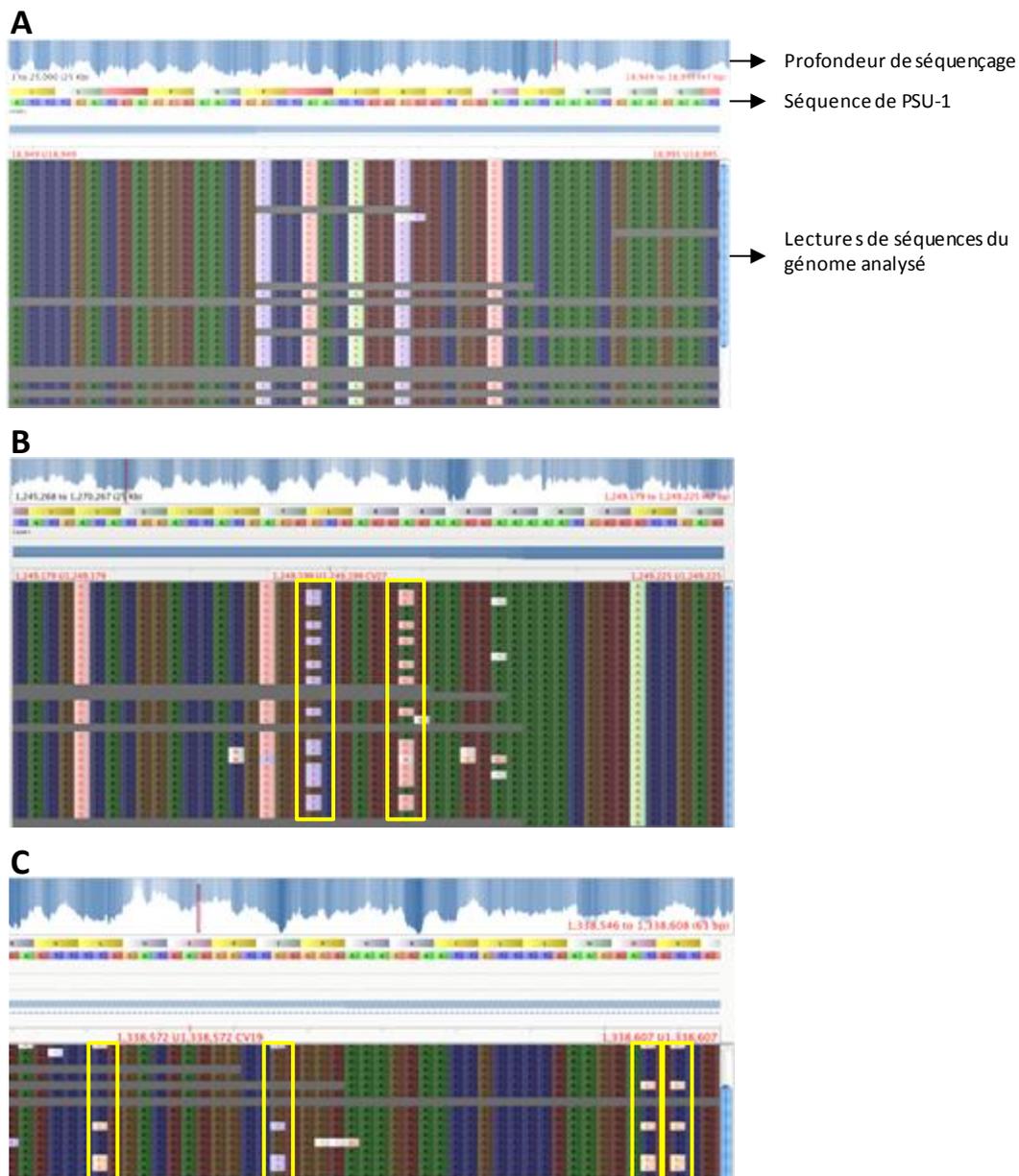
Génomes publics (numéro d'accèsion Genbank) : a, ATCC BAA 1163 (AAUV00000000) ; b, PSU-1 (CP000411.1) ; c, VP41 (AWRIB429, ACSE00000000).

## 2. Analyse et comparaison des génomes d'*O. oeni*

### 2.1. Séquençage, assemblage et annotation des génomes

Le séquençage des génomes d'*O. oeni* s'inscrit dans l'ensemble des thématiques de recherche du laboratoire. Dans notre cas, l'objectif a été de comparer les séquences génomiques de souches d'*O. oeni* caractérisées pour leurs propriétés technologiques et de rechercher des marqueurs génétiques à l'origine de ces phénotypes. En 2010 au laboratoire, 19 souches d'*O. oeni* ont été séquencées par la technologie 454 à la plateforme génomique de Toulouse (Genotoul). Parmi elles, 10 appartiennent à la collection d'étude et ont été choisies selon leurs propriétés technologiques ; les 9 autres concernent d'autres projets de recherche du laboratoire. Deux runs de séquençage regroupant 7 et 12 souches d'*O. oeni* ont été programmés avec une couverture de séquençage prévue entre 15X et 30X. A chaque fois, nous avons participé au séquençage des génomes et une semaine de travail a été nécessaire pour vérifier la quantité et la qualité des ADN génomiques, préparer une banque d'ADN simple brin de qualité pour chaque échantillon, amplifier par PCR en émulsion et purifier les fragments obtenus et enfin réaliser la réaction de séquençage.

Le nettoyage, l'assemblage des séquences et les nombreux contrôles qualité ont également été pris en charge par l'équipe de Toulouse qui nous a ensuite fourni l'assemblage et le bilan complet associé à chaque génome. A partir des lectures de séquences d'en moyenne 400 bases, l'assemblage *de novo* réalisé avec l'outil Newbler a permis de générer des génomes sous la forme de " draft " contenant 18 à 186 contigs au total et 12 à 70 contigs de tailles supérieures à 500 bases, avec une couverture de séquençage moyenne de 40X (Tableau 15). La valeur N50 renseigne sur la qualité de l'assemblage en donnant la taille du plus petit contig pour laquelle 50% des bases sont contenues dans des contigs plus grands. Par exemple pour IOEB 0205, seulement quatre contigs de tailles supérieures à 157775 pb couvrent 50% de la taille du génome alors que pour la souche IOEB 9613, 37 contigs (>15749 pb) sont nécessaires pour couvrir la moitié du génome. D'après les données présentées dans le Tableau 15, les séquences génomiques des " souches " 9701 et 9613 (hors de la collection d'étude) se caractérisent par une taille de génome anormalement élevée par comparaison à la taille moyenne du génome d'*O. oeni* qui



**Figure 45. Visualisation des contaminations génomiques.** L'illustration correspond à des assemblages par "mapping" des génomes sur le génome assemblé de PSU-1 obtenu à l'aide du logiciel Tablet **(A)** Génome non contaminé présentant cinq polymorphismes de simple nucléotide (clair) sur la région sélectionnée. **(B)** Génome contaminés, non exploitables de type IOEB 9613 ou IOEB 9701 où deux allèles apparaissent très fréquemment tout au long du génome (encadré jaune). **(C)** Cas de S11 où quelques séquences contaminées ont été détectées mais elles sont moins importantes et moins fréquentes (encadré jaunes). L'allèle majoritaire est souvent bien identifiable.

est de 1,8 Mpb, un nombre important de contigs (495 et 561, respectivement) et une valeur de N50 très basse (24426 et 15749 pb, respectivement). Des analyses complémentaires réalisées grâce au logiciel Tablet et basées sur le " mapping " des génomes contre celui de PSU-1 nous ont permis de visualiser toutes les lectures de séquences obtenues pour un locus donné et ont révélé pour ces souches des séquences hétérogènes et la présence régulière de deux allèles suggérant une contamination liée à un mélange de deux ou plusieurs souches (Figure 45). En l'état, ces génomes ne sont pas exploitables. Dans de moindres mesures, le génome de la souche S11 contient également des séquences liées à une contamination mais il reste exploitable et a été maintenu pour l'analyse de génomique comparative car S11 présente des qualités œnologiques intéressantes à étudier. Celle-ci a été purifiée par criblage de plusieurs colonies à l'aide d'une PCR spécifique de la souche S11 majoritaire (Résultats et discussion, Chapitre 3) et d'une PCR ciblant le plasmide pOENI-1v2 puis l'ADN génomique a été envoyé de nouveau à séquencer pour vérification.

A partir des séquences assemblées en contigs, une annotation automatique a été réalisée à l'aide du logiciel RAST qui prédit chaque ORF et qui leur attribue une fonction et si possible une famille protéique d'après la base de données FIGfams (Aziz *et al.*, 2008 ; Meyer *et al.*, 2009). Les trois génomes publics des souches PSU-1, ATCC BAA 1163 et AWRIB429 (VP41) appartenant à la collection d'étude ont été annotés de la même façon pour faciliter les comparaisons. Au total, nous disposons donc de 20 génomes d'*O. oeni* (17 séquencés au laboratoire + 3 déposés dans les banques de données publiques) pour les différents projets de recherche. Actuellement, un troisième run de séquençage de 24 souches du genre *Oenococcus* dont 10 appartiennent à la collection d'étude, est actuellement en cours, il est basé cette fois sur la technique Illumina et réalisé par la société Macrogen. De nouvelles séquences récemment publiées par Borneman *et al.* (2012a) n'ont pas été prises en compte lors de ces travaux mais les résultats de leur étude seront discutés.

## 2.2. Caractéristiques générales des génomes

D'après nos données et en accord avec les séquences publiées (Mills *et al.*, 2005 ; Borneman *et al.*, 2012a), le génome d'*O. oeni* a une taille moyenne de  $1,82 \pm 0,06$  Mb et code  $1882 \pm 66$  ORFs (Tableau 15) ; il est un des plus petits parmi les bactéries lactiques

**Tableau 16. Choix des groupes phénotypiques à comparer pour chaque variable sélectionnée.**

Rendement de production			Taux de survie			FML active		
	Valeurs (g/l)	Code		Valeurs (%)	Code		Valeurs (j)	Code
B16	0,5	-	B16	0	-	IOEB 9304	177	-
S28	1,7	-	S22	0	-	ATCC BAA 1163	96	-
IOEB 0501	4,8	-	S25	2	-	S25	93	-
ATCC BAA 1163	7,7	-	S13	4	-	IOEB 0501	75	-
S22	8,5	-	IOEB 9304	18	±	IOEB 0608	31	±
S13	17,0	±	ATCC BAA 1163	19	±	B16	17	±
S25	26,9	±	SB3	24	±	S11	14	+
IOEB 9304	30,6	±	AWRI429	32	±	AWRI429	13	+
SB3	33,8	±	S11	38	±	S28	11	+
IOEB 0608	60,0	+	IOEB 0608	97	+	S13	10	+
S11	71,9	+	PSU-1	116	+	S22	ND	
VP41	93,4	+	IOEB 0501	178	+	PSU-1	ND	
PSU-1	97,7	+	S28	191	+	SB3	ND	

(Makarova *et al.*, 2006 ; Makarova *et al.*, 2007). Grâce à l'outil " pan-génomique " développé par Hugo Campbell-Sills (2012), l'analyse des 20 séquences génomiques basée sur la comparaison des annotations (fonction + famille protéique associée) attribuées à chaque ORFs a permis de déterminer le pan-génomique d'*O. oeni* par l'identification des gènes conservés et des gènes accessoires constituant le core-génomique et l'éco-génomique, respectivement. Le pan-génomique a ainsi été estimé à 2548 ORFs au total ; 791 ORFs appartiennent au core-génomique et les 1757 ORFs restantes constituent l'éco-génomique. On distingue, dans ce dernier, les gènes accessoires partagés par au moins deux souches (shell-génomique, 1320 ORFs) et les gènes spécifiques à une unique souche (cloud-génomique, 437 ORFs). Cependant, ces données ne sont pas exhaustives car il existe quelques erreurs d'annotation. Pour exemple, une ORF annotée comme " Peptidoglycan interpeptide bridge formation enzyme " est spécifique de la souche B16. Mais après vérification par Blast, des séquences similaires ont été retrouvées dans les 19 autres génomes et sont plutôt annotées comme " tRNA-dependent lipid II-AlaAla-L-serine ligase ". Dans des cas moins extrêmes que celui-ci, certaines ORFs identiques ayant des annotations similaires mais formulées différemment sont également considérées comme distinctes. Pour la suite de l'analyse, des vérifications manuelles ont donc été systématiquement effectuées.

## **2.3. Recherche de corrélations entre génomes et phénotypes**

### **2.3.1. Analyse des génomes de différents groupes de souches**

L'étude de génomique comparative réalisée par Hugo Campbell-Sills avait pour objectif de rechercher des déterminants génétiques à l'origine des propriétés technologiques précédemment mesurées. Pour cela, nous disposons des génomes de 13 souches caractérisées phénotypiquement. Les comparaisons génomiques ont été basées sur la présence/absence de gènes et ont consisté à rechercher des marqueurs génétiques spécifiques d'un groupe phénotypique donné. Les gènes du core-génomique ont été exclus car ils sont conservés dans l'ensemble des souches étudiées et seul l'éco-génomique a été analysé.

Tout d'abord, la démarche a consisté à sélectionner les variables à étudier et à définir les groupes phénotypiques à comparer. Nous avons choisi de considérer seulement les variables statistiquement indépendantes entre elles, soit le rendement de production, le

**Tableau 17. Présence/absence des gènes chez les 13 souches séquencées et caractérisées pour les variables " taux de survie " et " FML active ".**

**A. Taux de survie**

	PSU-1	S28	0501	0608	9304	VP41	S11	SB3	1163	B16	S13	S22	S25
Code du phénotype	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	-	-
Predicted transcriptional regulator	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Serine O-acetyltransferase( EC:2.3.1.30 )	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<u>NADPH:quinone reductase related Zn-dependent oxidoreductase</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Transcriptional regulator, MarR family	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Phosphoglycerate mutase family 2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<u>AraC-like transcriptional regulator (HTH and ligand binding domain)</u>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Transcriptional regulator, AraC family	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Xyloside transporter XynT	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0

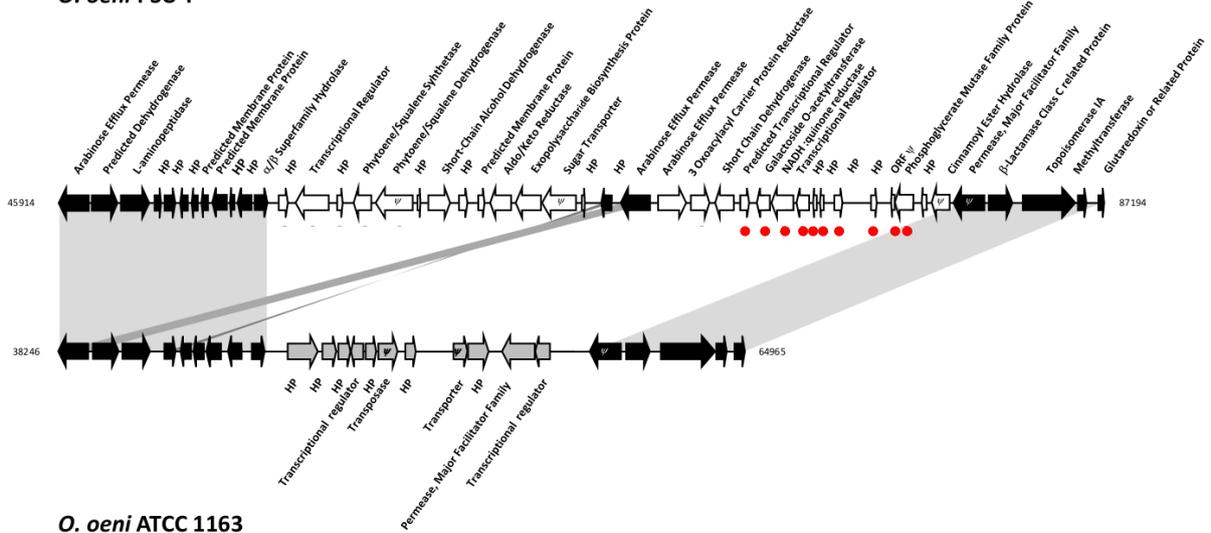
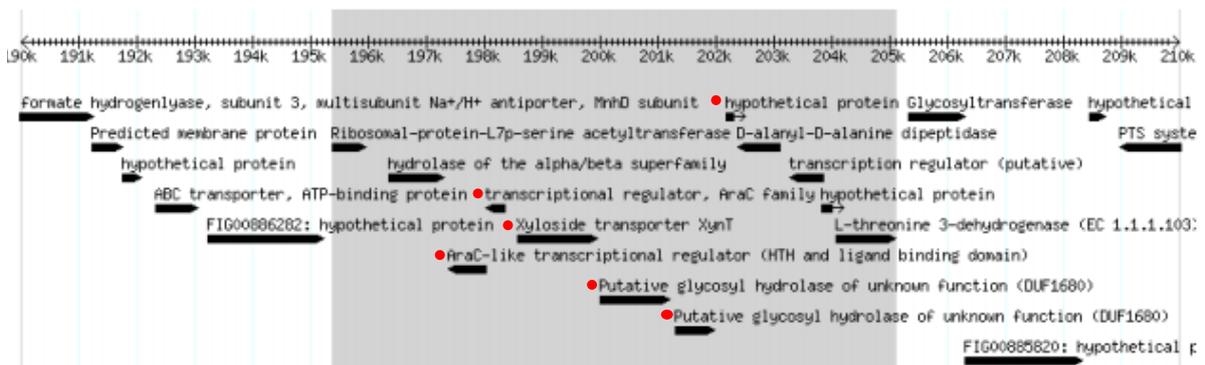
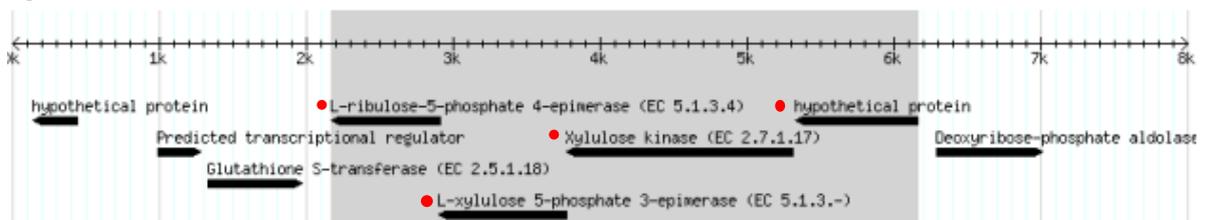
**B. FML active**

	S28	VP41	S11	S13	0608	B16	0501	9304	1163	S25	PSU-1	S22	SB3
Code du phénotype	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-	ND	ND	ND
L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase (EC 5.1.3.4)	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.-)</u>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Xylulose kinase (EC 2.7.1.17)	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hypothetical protein	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hol44	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Phage replication initiation	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Gras, gène détecté lors de la comparaison des génomes ; souligné, gène recherché par PCR chez les 44 souches d'*O. oeni*.

taux de survie à l'inoculation et la durée de la FML active. En effet d'après l'analyse des corrélations, la phase de latence est dépendante du taux de survie et la durée de la FML totale est liée étroitement à la FML active (Paragraphe 1.4.3, Tableau 14). Pour chacune de ces trois variables, deux groupes de souches présentant, l'un, les meilleures performances (noté " + ") et l'autre, les performances les plus faibles (noté " - ") ont été définis. Afin d'assurer une comparaison pertinente des phénotypes, des groupes " + " ou " - " assurant une distance maximale entre les valeurs observées ont été choisis pour chaque variable et contiennent chacun seulement quatre souches (Tableau 16). Les groupes " - " formés par des souches avec un rendement de production  $\leq 8$  g/l, un taux de survie inférieur à  $\leq 4\%$  ou une durée de ML active  $\geq 75$  jours ont été comparés aux groupes " + " contenant des souches avec un rendement de production  $\geq 60$  g/l, un taux de survie  $\geq 97\%$  ou une durée de FML active  $\leq 14$  jours. Toutes les souches n'étant pas performantes pour tous les phénotypes mesurés, la composition des groupes est variable. Par exemple, la souche S28 est classée dans le groupe " - " pour le rendement de production alors qu'elle appartient aux groupes " + " pour le taux de survie et la FML active.

L'éco-génome des souches sélectionnées et classées dans les groupes " + " ou " - " a été comparé afin d'identifier des gènes spécifiques des groupes phénotypiques et ceci pour chacune des variables. Pour cela, l'outil " pan-génome " a été utilisé ; les ORFs communes aux deux groupes ont été exclues et seules les ORFs accessoires ont été étudiées. Une première liste de gènes spécifiques de chaque groupe phénotypique " + " et " - " a été générée sauf pour la variable " rendement de production " où aucun gène n'a été identifié. Puis, une analyse à l'aide de l'outil Blast a permis d'exclure les éventuelles erreurs liées aux annotations ou à la présence d'ORFs tronquées et de sélectionner uniquement celles qui étaient présentes chez un groupe et absentes chez l'autre. Enfin, l'analyse de leur environnement génétique a révélé que certaines se regroupaient physiquement sur le chromosome et a permis de détecter de nouvelles ORFs spécifiques d'un phénotype donné. Finalement, seuls les groupes performants " + " ont présenté des gènes spécifiques pour les variables " taux de survie " et " FML active ", 16 et 6 respectivement (Tableau 17). Le profil " présence/absence de gènes " obtenu par la recherche des ORFs par Blast est différent pour les souches présentant des performances intermédiaires "  $\pm$  ". Par exemple pour la variable " taux de survie ", les souches S11, SB3 et VP41 capables de survivre à l'inoculation dans le

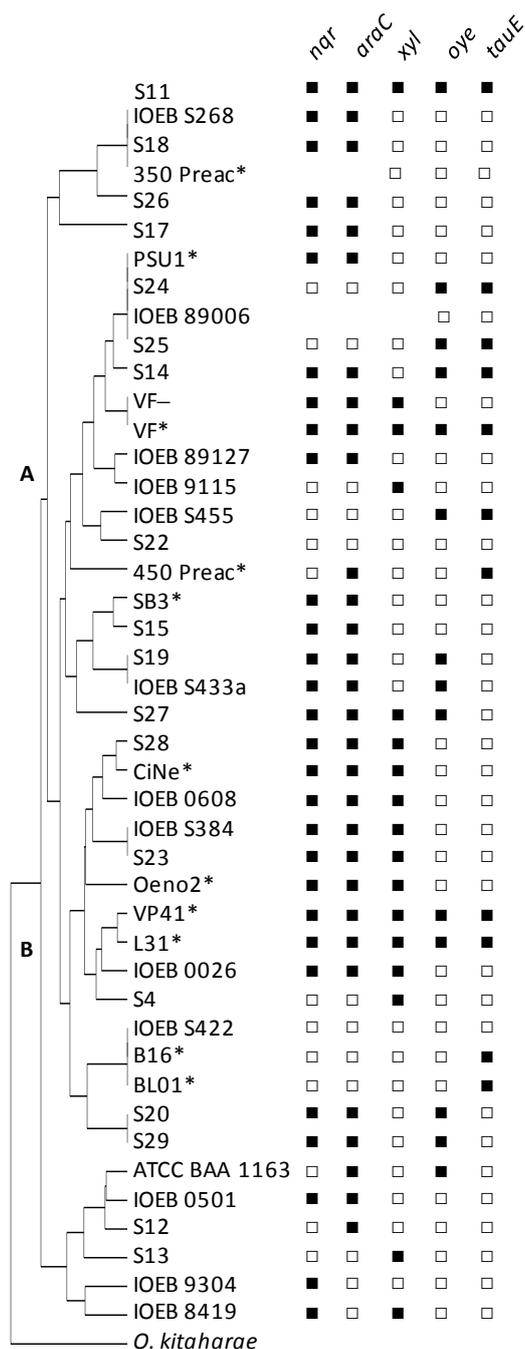
**A***O. oeni* PSU-I*O. oeni* ATCC 1163**B****C**

**Figure 46. Régions de plasticité génomique détectées sur le chromosome d'*O. oeni*.** (A) Région d'environ 30 kpb contenant 10 ORFs spécifiquement présentes chez les souches capables de survivre à l'inoculation dans le vin (rouge). Chez ATCC BAA 1163 sensible à l'inoculation (taux de survie de 19%), ces ORFs sont absentes. (D'après Bon *et al.*, 2009) (B) Région d'environ 10 kpb (gris) comprenant 6 ORFs (rouge) détectées uniquement chez les souches capables de survivre à l'inoculation dans le vin (>20%). (C) Région de 4 ORFs spécifiques (rouge) des souches capables de mener une FML active rapide (>14 jours).

vin à plus de 20% contiennent 16/16 gènes comme pour celles du groupe "+" alors que 9304 et ATCC BAA 1163 n'en portent que 10 et 6, respectivement et ont un taux de survie inférieur à 20%.

### 2.3.2. Détection de régions de plasticité génomique

A travers cette analyse et au-delà des gènes détectés, quatre régions génomiques variables ont été mises en évidence. Les 16 gènes spécifiques des souches capables de survivre à l'inoculation dans le vin (taux de survie >20%) sont situés sur deux régions de plasticité. La première, déjà décrite par Bon *et al.* (2009), contient 30 gènes ( $\approx$ 30kpb) dont certains sont impliqués dans le transport, le métabolisme des sucres et la biosynthèse de caroténoïdes (Figure 46A). D'après les analyses par Blast, toutes les souches classées dans les groupes "+" et "±" ne contiennent pas la totalité des 30 gènes mais une grande majorité ; par contre, cette région est complètement absente chez les souches "-". La seconde d'environ 10kpb est composée de 12 ORFs liées principalement aux métabolismes des sucres et des acides aminés (Figure 46B). Le contenu génétique de ces régions (en nombre de gènes) est également variable selon les souches ; la quasi-totalité de l'îlot est absent chez celles ayant un taux de survie le plus bas, et inversement. Le groupe phénotypique caractérisé par une FML active très courte (<14 jours) contient quatre gènes co-localisés codant trois enzymes responsables de la conversion du L-xylulose en D-xylulose qui sont liées étroitement à la voie des pentoses-phosphates et une protéine hypothétique (Figure 46C). Dans ce cas, soit les quatre gènes sont présents, soit ils sont absents. La souche IOEB 0608 classée "±" qui a mené une FML active en un temps relativement court (31 jours) contient également ces gènes. Par contre, les souches PSU-1, S22 et SB3 pour lesquelles la durée de FML active n'a pu être déterminée (absence de début de FML ou FML languissante) ne portent pas ces gènes comme celles du groupe "-". La quatrième région identifiée est associée à un phage d'*O. oeni*. Les deux gènes détectés codent des mécanismes de répllication et de lysogénie et leur environnement génétique apparait variable selon les souches.

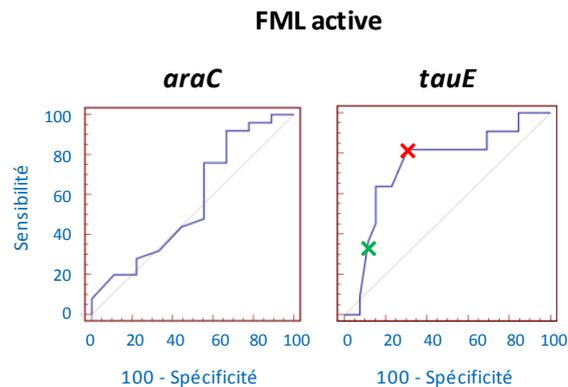


**Figure 47. Distribution des gènes d'intérêt au sein de la collection de 44 souches d'*O. oeni*.** Le dendrogramme a été construit à partir des profils NotI-PFGE de chaque souche, à l'exception de S11 sans profil qui est placé en haut du dendrogramme. D'après une analyse MLST, elle est phylogénétiquement proche des souches B16, BL01 et IOEB S422. Carré blanc, absence du gène ; carré noir, présence du gène ; astérisque, levain malolactique. En cas de résultats douteux, les résultats ne sont pas présentés (absence de carré).

### 2.3.3. Analyse de la collection de 44 souches d'*O. oeni*

L'analyse de génomique comparative réalisée sur un petit panel de souches et sur des valeurs qualitatives a induit inévitablement un certain biais. Il a donc été nécessaire d'étudier la présence/absence de ces gènes sur une collection plus large comprenant 44 souches d'*O. oeni* caractérisées pour leurs propriétés technologiques. Dans un premier temps, trois gènes, chacun spécifique d'une région génomique et d'un phénotype, ont été choisis afin de valider la démarche entreprise (Tableau 17). Le premier est présent chez les souches capables de mener une FML rapide et code une L-xylulose 5-phosphate 3-épimérase (nommé *xyl*) ; les deux autres sont détectés chez les souches capables de survivre à l'inoculation dans le vin et localisés sur deux régions génomiques différentes, ils codent une quinone réductase NADPH dépendante (nommé *nqr*) et un régulateur transcriptionnel de la famille AraC (nommé *araC*).

Ces trois gènes ont été recherchés chez les 44 souches par PCR multiplex ciblant, à chaque fois, un gène d'intérêt *xyl*, *nqr* ou *araC* (*xyl1-xyl2*, *nqr1-nqr2*, *araC1-araC2*) et le gène *rpoB* (contrôle PCR). Le profil " présence/absence de gènes " obtenu pour chaque souche est présenté dans la Figure 47, les gènes *oye* et *tauE* sont également montrés. Divers profils sont observés au sein de la collection. Les cinq gènes d'intérêt potentiel sont tous absents chez deux souches IOEB S422 et S22 aux propriétés technologiques très médiocres (Paragraphe 1.4, Figure 40, Figure 41 et Figure 42) alors qu'ils sont tous présents chez quatre souches performantes S11, L31, VF et VP41 qui portent également un plasmide de type pOENI-1. Alors que les gènes *oye* et *tauE* sont distribués aléatoirement, la présence des trois autres gènes *nqr*, *araC* et *xyl* est majoritairement associée à des sous-groupes génétiques. Les souches S28, CiNe, IOEB 0608, IOEB S384, S23, OENO2, VP41, L31 et IOEB 0026 regroupées dans le dendrogramme portent notamment ces trois gènes. Par contre, la distribution hétérogène observée dans le groupe B est probablement liée au faible nombre de souches analysées.



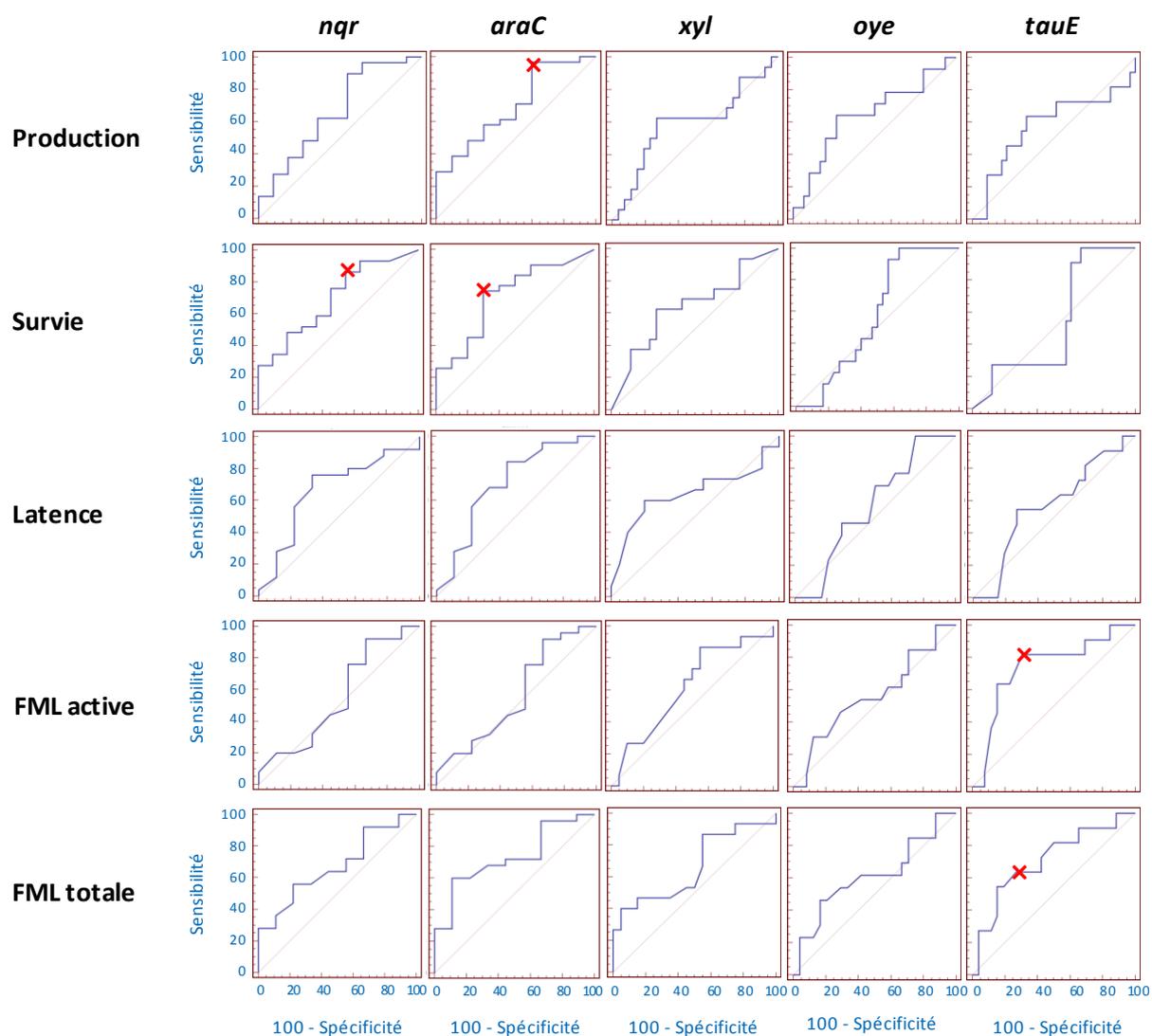
**Figure 48. Exemples de courbes ROC.** Ces deux courbes ont été construites à partir de la variable quantitative " FML active " et du classificateur binaire " présence – absence " du gène *araC* ou *tauE* à l'aide du logiciel Medcalc. La diagonale (rose clair) de coordonnées (0,0 ; 1,1) indique une aire sous la courbe égale à 0,5 et un test diagnostique sans intérêt. Pour le gène *araC*, l'aire sous la courbe n'est pas significative. Par contre, la courbe ROC obtenue pour le gène *tauE* est significative. La croix rouge indique la valeur seuil optimale :  $\leq 24$  jours, Se = 82%, Sp = 69% et la croix verte indique une valeur seuil choisie par nos soins selon une durée de FML active plus courte :  $\leq 14$  jours, Se = 36%, Sp = 88%.

### 2.3.4. Choix des analyses statistiques pour la validation des gènes d'intérêt

Au sein de la collection, la proportion entre gènes présents et gènes absents étant relativement équilibrée, des tests statistiques ont pu être réalisés afin d'évaluer le poids des gènes sélectionnés en tant que marqueurs génétiques de souches performantes pour un phénotype donné. Les gènes *nqr*, *araC*, et *xyl* ont finalement été testés sur l'ensemble des cinq variables étudiées bien qu'ils aient été détectés pour des variables spécifiques. Les gènes *oye* et *tauE*, présents sur les plasmides de type pOENI-1 ou sur le chromosome, ont été ajoutés à l'analyse, car ils représentent également des marqueurs génétiques des souches d'intérêt industriel.

Les variables quantitatives n'étant pas caractérisées par une distribution suivant une loi normale, le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été choisi. Il est l'équivalent du test paramétrique de Student utilisé pour la comparaison des moyennes de deux échantillons. Dans notre cas, il amène à conclure sur l'hypothèse selon laquelle la distribution de la variable dépend de la présence/absence d'un gène, autrement dit si le gène étudié permet la discrimination des souches selon leurs performances technologiques. En complément de ces résultats, la courbe ROC nous a semblé intéressante car elle accorde plus de liberté dans l'interprétation et fournit également plus d'informations qu'un test statistique classique. La courbe ROC est un outil statistique qui permet de décrire un classificateur binaire et d'évaluer les performances d'un test. Cette analyse est très utilisée en médecine pour déterminer les qualités diagnostiques des tests biologiques. La courbe ROC décrit, pour chaque valeur " biologique " mesurée, la sensibilité (Se, proportion de vrais positifs) et la spécificité (Sp, proportion de vrais négatifs) du test.

Dans l'exemple de la Figure 48, les courbes associées aux gènes *araC* et *tauE* ont été construites à partir des valeurs de durée de FML active grâce au logiciel Medcalc (Stephan *et al.*, 2003). Pour chacune, il a été calculé la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) du test, c'est-à-dire quel est le pourcentage de souches portant le gène qui ont une durée de FML active inférieure à la valeur considérée (Se) et quel est le pourcentage de souches ne portant pas le gène qui ont une durée de FML active supérieure à la valeur considérée (Sp), indiquant le risque de se tromper si cette valeur est choisie comme critère diagnostique. Une fois, la courbe construite, le premier critère statistique à observer correspond à l'aire sous la courbe



**Figure 49. Courbes ROC générées pour chaque couple " gène - variable phénotypique ".** Le logiciel MedCalc a été utilisé pour construire les courbes ROC et obtenir les bilans statistiques associés. La diagonale (rose clair) indique un test d'intérêt diagnostique nul. Les croix rouge représentent les valeurs seuil optimales calculées pour les courbes ROC significatives.

(AUC) qui s'appuie sur la statistique U de Mann-Whitney et qui traduit la qualité du classificateur binaire choisi. Elle doit être significativement différente de 0,5, seuil obtenu pour la diagonale (0,0 ; 1,1) représentant un test sans aucun intérêt diagnostique. Par exemple, l'aire sous la courbe obtenue avec le gène *tauE* est significative alors qu'elle ne l'est pas pour le gène *araC*. A cette étape, on peut seulement conclure sur le fait que le gène *tauE* est capable de discriminer les souches selon leur performance à réaliser la FML active ce qui n'est pas le cas du gène *araC* (Figure 48). Ce critère validé, le test peut être finalisé par le choix d'une valeur seuil optimale (Se et Sp proches de 1) pour laquelle le test est le plus performant c'est-à-dire qu'il existe le moins de risques de se tromper quant à la conclusion. La courbe ROC significative obtenue pour *tauE* traduit un test diagnostique performant, de pertinence technologique, caractérisé par une valeur seuil optimale de  $\leq 24$  jours, une sensibilité et une spécificité élevée (82% et 69%, respectivement). Cette valeur n'est pas fixe mais assure un compromis entre la sensibilité et la spécificité du test. Si on choisit, par exemple, de rechercher les souches menant la FML active en moins de 14 jours alors le test devient beaucoup moins performant avec une sensibilité de 36% c'est à dire que seuls 36% des souches qui ont le gène *tauE*, ont une FML active inférieure à 14 jours.

### 2.3.5. Validation des gènes d'intérêt par analyses statistiques

Un test U de Mann-Whitney et une courbe ROC ont été générés pour chacune des modalités grâce aux logiciels Statistica et MedCalc, respectivement (Figure 49). Sur les 25 modalités étudiées, seuls cinq ont donné une statistique U et une aire sous la courbe significatives indiquant que les gènes *nqr*, *araC* et *tauE* permettent de discriminer les souches selon leurs performances technologiques (rendement de production, survie à l'inoculation, FML active ou FML totale). Les résultats obtenus par les deux outils statistiques sont concordants. Les gènes *xyl* et *oye* analysés indépendamment n'apparaissent pas comme des gènes discriminants, quelque soit la variable étudiée. Pourtant, le gène *xyl* avait été mis en évidence lors de l'analyse de génomique comparative et était présent chez les souches capables de mener une FML active rapide. Ce résultat confirme l'importance d'une vérification des gènes d'intérêt potentiel sur une plus large collection de souches caractérisées phénotypiquement. Malgré des tests statistiques significatifs pour la variable "taux de survie", le gène *nqr* ne se révèle pas pertinent car d'après la courbe ROC, il est



discriminant à une valeur seuil de 5% qui correspond à un taux de survie bien trop faible pour qualifier une souche comme résistante à l'inoculation dans le vin.

Le gène *araC* apparaît intéressant car il est à l'origine de tests diagnostiques qui permettent de classer les souches selon leur rendement de production et leur taux de survie comme prédit par l'analyse de génomique comparative. Pour ces modalités où le gène *araC* semble être un bon marqueur génétique des souches d'intérêt industriel, les caractéristiques du test fournies par la courbe ROC c'est-à-dire sa sensibilité et sa spécificité pour la valeur seuil optimale ont été analysées. Concernant la variable " rendement de production ", le test diagnostique donne une valeur seuil optimale très basse (4,2 g/l) qui n'a pas un intérêt technologique. Si l'on choisit une autre valeur seuil (par exemple, >30,6 g/l), la sensibilité diminue à 58% et la spécificité augmente à 70%. Le test devient alors acceptable mais il donnerait 42% de faux négatifs (souches portant le gène qui ont un rendement de production inférieur à 30,6 g/l,  $100 - Se$ ) et impliquerait encore une vérification en laboratoire lourde. Par contre, le gène *araC* permet de discriminer les souches d'intérêt œnologique qui ont un taux de survie >21%, une valeur acceptable car elle est souvent observée après une inoculation dans le vin.

Des tests diagnostiques performants ont également été obtenus pour le gène *tauE* qui permet de discriminer les souches caractérisées par des durées de FML courtes. Si on s'intéresse à ce marqueur pour la variable " FML active ", la sensibilité du test indique que 82% des souches qui portent le gène ont mené la FML active en moins de 24 jours et la spécificité indique que 69% des souches n'ayant pas le gène ont présenté une FML active supérieure à 24 jours. La recherche du gène *tauE* permet également de détecter les souches qui ont réalisé la FML totale en moins de 38 jours, le test est caractérisé par des valeurs de sensibilité (64%) et spécificité (73%) relativement élevées, limitant le risque de se tromper sur la performance des souches lors de la recherche du gène *tauE*.

Pour tenter d'obtenir des tests diagnostiques plus performants, nous avons testé des combinaisons de deux gènes et réalisé les courbes ROC correspondantes. Dans ce cas, les propriétés technologiques des souches portant simultanément les deux gènes choisis ont été comparées à celles des souches qui ont un seul ou aucun des deux gènes. De nombreuses combinaisons des cinq gènes étudiés ont abouti à des tests diagnostiques performants.

**Tableau 18. Validation des gènes d'intérêt technologique par les analyses statistiques.**

	Nombre de souches		Test U de Mann-Whitney		Courbe ROC				
	Absence du gène	Présence du gène	U	p_value	AUC <sup>a</sup>	p_value	Valeur seuil	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
<b>Production</b>									
<i>araC</i>	12	30	85	0,0083	0,697	0,0194	> 4,2 g/l	97	40
<i>nqr*araC</i>	15	27	125	0,0422	0,691	0,0201	> 30,6 g/l	63	73
<i>xyl*oye</i>	38	5	40	0,0407	0,784	0,0251	> 35,1 g/l	100	67
<i>xyl*tauE</i>	39	4	28	0,0317	0,825	0,0132	> 39,3 g/l	100	70
<b>Survie</b>									
<i>nqr</i>	13	29	102,5	0,0189	0,693	0,0289	> 5%	86	45
<i>araC</i>	12	30	101	0,0278	0,710	0,0067	> 21 %	77	70
<i>nqr*araC</i>	15	27	103,5	0,0080	0,744	0,0013	> 21 %	78	60
<b>Latence</b>									
<i>nqr*araC</i>	15	27	78,5	0,0382	0,716	0,0222	≤ 14 j	76	69
<i>nqr*tauE</i>	37	5	29	0,0231	0,819	0,0001	≤ 9 j	100	75
<b>FML active</b>									
<i>tauE</i>	33	11	75	0,0236	0,738	0,0047	≤ 24 j	82	69
<i>nqr*tauE</i>	37	5	25	0,0143	0,844	0,0001	≤ 24 j	100	63
<i>araC*tauE</i>	37	5	27	0,0239	0,820	0,0001	≤ 24 j	100	63
<i>xyl*oye</i>	38	5	31,5	0,0399	0,790	0,0018	≤ 18 j	80	80
<i>xyl*tauE</i>	39	4	14,5	0,0116	0,890	0,0001	≤ 18 j	100	79
<b>FML totale</b>									
<i>tauE</i>	33	11	83,5	0,0478	0,708	0,0185	≤ 38 j	64	73
<i>nqr*xyl</i>	28	14	77	0,0238	0,731	0,0067	≤ 57 j	92	45
<i>nqr*oye</i>	30	12	69,5	0,0413	0,722	0,0132	≤ 42 j	70	60
<i>nqr*tauE</i>	37	5	11,5	0,0020	0,928	0,0001	≤ 30 j	100	81
<i>araC*xyl</i>	29	13	66	0,0122	0,761	0,0013	≤ 42 j	66	61
<i>araC*tauE</i>	37	5	22	0,0123	0,853	0,0001	≤ 35 j	100	70
<i>xyl*oye</i>	38	5	24,5	0,0171	0,837	0,0001	≤ 27 j	80	87
<i>xyl*tauE</i>	39	4	6,5	0,0035	0,951	0,0001	≤ 27 j	100	88
<i>oye*tauE</i>	36	8	60,5	0,0404	0,739	0,0079	≤ 30 j	75	86

a, aire sous la courbe ROC ; gris, gène seul ou gènes combinés présentant les meilleurs résultats statistiques.

Cependant, certaines d'entre elles, comme *araC\*tauE*, *nqr\*tauE*, *xyl\*tauE* et *xyl\*oye*, se sont révélées extrêmement restrictives puisque seulement quatre ou cinq souches comportent les deux gènes. Les tests qui en découlent sont très puissants ; par exemple, 100% des souches qui ont les gènes *xyl* et *tauE* ont un rendement de production supérieur à 39,3 g/l, une FML active inférieure à 18 jours et une FML totale inférieure à 27 jours (Tableau 18). Mais au vu du très faible nombre de souches qui comportent ces gènes combinés, une validation des tests est indispensable sur un plus large panel pour exclure l'effet de l'effectif. Certaines combinaisons de gènes permettent d'améliorer le test par rapport à l'analyse des gènes seuls. Par exemple, celle associant les gènes *nqr* et *araC* permet de discriminer les souches ayant un rendement de production supérieur à 30,6 g/l et une phase de latence courte, inférieure à 14 jours (Tableau 18). La détection combinée des gènes *oye* et *tauE* apparaît comme un test diagnostique performant puisqu'il aboutit à la discrimination des souches menant la FML totale en moins de 30 jours, critère essentiel et un des plus importants pour la sélection des souches d'intérêt industriel.

Pour résumer, le gène *tauE* apparaît comme un bon marqueur génétique des durées de FML. Associé au gène *oye*, il permet de sélectionner des souches capables de mener des FML rapides. Les gènes *araC* et *nqr* sont plutôt associés aux propriétés technologiques telles que le rendement de production, le taux de survie et la durée de la phase de latence. Malgré une fonction associée à la voie centrale des pentoses-phosphates, le gène *xyl* n'a pas été révélé comme un marqueur génétique des souches performantes.



## 3. Discussion

### 3.1. Identification de gènes d'intérêt technologique

L'objectif des travaux était de combiner des analyses phénotypiques et génomiques d'une collection de diverses souches d'*O. oeni* pour identifier les gènes caractéristiques des souches d'intérêt technologique. Pour cela, plusieurs nouvelles méthodes ont été mises en place : (i) la caractérisation phénotypique des souches d'*O. oeni* après leur préparation sous forme lyophilisée et leur classification selon leurs aptitudes technologiques, (ii) le séquençage et la comparaison des génomes de groupes de souches ayant des propriétés phénotypiques bien distinctes, et (iii) l'analyse des données par des courbes ROC ; des tests statistiques qui n'avaient jamais été utilisés auparavant pour des données de microbiologie appliquée. Ces travaux ont permis d'identifier 22 gènes qui sont groupés dans quatre régions génomiques et associés aux souches qui présentent une bonne survie lors de leur inoculation dans le vin, ou la capacité à réaliser la FML rapidement.

Certains de ces gènes avaient déjà été détectés par d'autres approches de génomique comparée basées sur la technique d'hybridation soustractive (Bilhère, 2009). Il s'agit en particulier de 10 gènes qui appartiennent à l'îlot génomique d'environ 30 kpb, présent chez la souche PSU-1 et absent chez ATCC BAA 1163 (Bon *et al.*, 2009). Cette région chromosomique comprend 30 gènes dont certains sont potentiellement impliqués dans le transport et le métabolisme des sucres ou la synthèse de caroténoïdes, molécules aux propriétés antioxydantes. Récemment, d'autres gènes liés au métabolisme des pentoses ont également été décrits chez des souches d'*O. oeni* notamment chez certains levains malolactiques (Borneman *et al.*, 2012a). Parmi eux, nous identifions quatre gènes lors de la comparaison des souches aux FML actives plus ou moins longues. Ils codent une protéine hypothétique et trois enzymes impliquées dans la conversion du L-xylulose en D-xylulose, composé intermédiaire de la voie des pentoses-phosphates.

Deux autres régions génomiques non décrites dans la littérature ont été détectées. L'une comprend 12 gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des sucres et des acides aminés dont six sont exclusivement présents chez les souches caractérisées par de bonnes capacités de survie à l'inoculation dans le vin. L'autre région est constituée de deux



gènes localisés sur le même type de phages d'*O. oeni* qui contient une zone variable contenant des gènes accessoires susceptibles de conférer un avantage adaptatif à la souche hôte (glycosyltransférase, transporteur de type ABC, perméase TauE, système de restriction-modification).

Enfin, l'analyse des plasmides de la famille " pOENI-1 " nous a également permis d'identifier de potentiels gènes d'intérêt technologique notamment les gènes *oye* et *tauE* codant respectivement, une oxydoréductase de la famille " Old Yellow Enzyme " et une perméase de la famille " Sulfite exporter TauE/SafE ". Localisés sur un plasmide ou sur le chromosome, ces gènes sont présents chez de nombreuses souches d'*O. oeni* dont plusieurs levains malolactiques et sont fréquemment détectés dans les vins en cours de FML.

Lors de différents travaux, plusieurs autres séquences spécifiques associées à d'autres régions de plasticité génomique avaient été identifiées et associées à l'adaptation des souches d'*O. oeni* au vin (Delaherche *et al.*, 2006 ; Athane *et al.*, 2008 ; Renouf *et al.*, 2008 ; Bon *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009). Cependant, aucune d'entre elles n'a été mise en évidence lors des comparaisons génomiques que nous avons réalisées. Néanmoins, cette étude n'est pas exhaustive et pas totalement complète car les génomes de seulement 13 des 44 souches testées phénotypiquement ont été séquencés, ce qui est insuffisant pour garantir les résultats de génomique comparée. A l'origine de ce projet, il était prévu de séquencer des génomes d'un plus grand nombre de souches caractérisées phénotypiquement, mais cela n'a pas pu être réalisé en temps utile pour des raisons budgétaires. Néanmoins, le laboratoire a récemment commandé le séquençage de 20 nouveaux génomes pour compléter cette étude. Il s'agit notamment de ceux de 9 souches qui ont été caractérisées phénotypiquement et qui présentent des propriétés technologiques diverses : S12, S14, S15, S19, S23, CiNe, VF, 350 Preac, 450 Preac. Ces génomes seront bientôt réalisés par la technologie Illumina (Macrogen, Corée du Sud), et disponibles pour relancer les analyses de génomique comparée et les tests statistiques associés. Ces nouvelles analyses seront notamment intéressantes dans le cas des souches présentant de bonnes capacités à être lyophilisées, car malgré une grande diversité des rendements de production, aucune séquence génétique spécifique n'a été identifiée pour ce phénotype. Ce processus industriel étant une étape obligatoire et déterminante dans la qualité des levains, il serait également intéressant de comparer ces mêmes souches au cours



du procédé de lyophilisation sur la base d'une analyse d'expression des transcriptomes et/ou protéomes.

### 3.2. Intérêt des résultats pour la sélection des souches d'*O. oeni*

A l'issue de ces travaux, cinq gènes au total ont été choisis comme potentiel marqueur génétique des souches d'intérêt industriel : les gènes *nqr*, *araC* et *xyl* spécifiques de trois régions chromosomiques variables, détectés lors de l'analyse de génomique comparative, et les gènes *oye* et *tauE*, identifiés lors de l'étude des plasmides de la famille " pOENI-1 ". Leur distribution au sein des 44 souches d'*O. oeni* aux propriétés technologiques définies a été déterminée, puis des tests statistiques ont permis d'évaluer leur capacité à discriminer des souches performantes pour un phénotype d'intérêt technologique donné.

Le gène *xyl* n'a pas été validé en tant que marqueur de sélection, bien qu'il soit pourtant probablement lié au métabolisme central, en participant à la conversion du L-xylulose en D-xylulose,. L'analyse fonctionnelle de cette voie de conversion, ainsi que la caractérisation des enzymes qui la composent, pourrait être envisagées pour déterminer leur rôle éventuel dans la voie des pentoses-phosphates.

Comme prédit lors de la comparaison des génomes, les gènes *araC* et *nqr*, seuls ou combinés, apparaissent comme de bons indicateurs des performances technologiques des souches, concernant la survie à l'inoculation dans le vin et la durée de la phase de latence, mais aussi le rendement de production. La présence de ces deux gènes associés respectivement à deux régions génomiques probablement impliquées dans le transport et le métabolisme des sucres et des acides aminés, pourrait conférer un avantage adaptatif aux souches dans des environnements hostiles à la survie et au développement bactérien.

Le gène *tauE* apparaît également comme un marqueur de sélection des souches caractérisées par des durées de fermentation courtes. Au final, sa présence semble corrélée aux souches qui, malgré les stress rencontrés au cours du procédé de lyophilisation et au moment de l'inoculation dans le vin, sont capables de mener une FML complète et rapide. De plus, la présence simultanée de *tauE* et *oye*, permet de discriminer plus efficacement les souches menant des FML inférieures à 30 jours.



Largement répandue dans le domaine médical pour élaborer des tests diagnostiques cliniques, la courbe ROC est une mesure statistique de la performance d'un classificateur binaire qui est utilisée en microbiologie appliquée pour la première fois dans cette étude. Grâce aux courbes ROC, nous sommes capables d'identifier un gène d'intérêt technologique, de décrire son pouvoir discriminant et de prédire les capacités technologiques des souches qui présentent ou non ce gène après seulement quelques PCR. Les résultats obtenus apparaissent très encourageants pour s'orienter vers une sélection génétique des souches d'*O. oeni* d'intérêt industriel, ce qui était jusqu'à présent difficilement envisageable. Au cours de travaux précédents, de nombreux gènes ont déjà été identifiés et décrits comme contribuant à l'adaptation des souches d'*O. oeni* au vin (Jobin *et al.*, 1999 ; Bourdineaud *et al.*, 2003 ; Beltramo *et al.*, 2004 ; Bourdineaud *et al.*, 2004 ; Coucheney *et al.*, 2005b ; Grandvalet *et al.*, 2005 ; Beltramo *et al.*, 2006 ; Delaherche *et al.*, 2006 ; Athane *et al.*, 2008 ; Grandvalet *et al.*, 2008 ; Renouf *et al.*, 2008 ; Bon *et al.*, 2009 ; Renouf *et al.*, 2009 ; Weidmann *et al.*, 2010). Cependant, certains de ces déterminants génétiques ne se sont pas toujours révélés efficaces pour traduire les propriétés technologiques recherchées (Zapparoli *et al.*, 2004 ; Athane *et al.*, 2008 ; Renouf and Favier, 2010). De plus, dans la plupart des cas, c'est la mesure d'expression du gène qui est le marqueur des performances des souches, une technique plus coûteuse et plus difficile à mettre en œuvre qu'une PCR pour détecter la présence/absence d'un gène, et qui ne s'avère pas adaptée à un travail de sélection sur un grand nombre de souches.

### **3.3. La diversité des souches de l'espèce *O. oeni***

Depuis la description de l'espèce (Garvie, 1967), la diversité phénotypique des souches d'*O. oeni* a été décrite au cours de nombreux travaux. Nous avons nous aussi observé des comportements très variables des souches au cours de la production industrielle et au cours de la vinification. Cette diversité est aussi présente au sein même des levains malolactiques. Les diversités génétique et génomique des souches de cette espèce ont également été rapportées par des travaux récents d'analyse de structure de population par MLST (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010) et par la comparaison des 14 génomes publiés actuellement (Borneman *et al.*, 2012a). L'espèce *O. oeni* se compose de deux principales sous-populations A et B évoluant probablement vers deux sous-espèces et



contenant des sous-groupes génétiques parfois associés à l'origine géographique ou au type de produits (Tenreiro *et al.*, 1994 ; Guerrini *et al.*, 2003 ; Bihère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010 ; Claisse and Lonvaud-Funel, 2012). Elle est caractérisée par un petit génome d'environ 1,8Mpb contenant entre 1799 à 2071 ORFs, suggérant la présence de nombreux gènes accessoires d'intérêt technologique potentiel (Mills *et al.*, 2005 ; Borneman *et al.*, 2012a). Dans cette étude, le pan-génome a été estimé à 2548 ORFs, dont 791 sont conservées dans le core- génome. Cependant, en raison des limites de l'annotation automatique que nous avons réalisé, nous pensons que le core-génome est ici sous estimé et inversement pour l'éco-génome. Pour comparaison, Borneman *et al.* (2012a) ont identifié 2846 et 1165 ORFs constituant le pan génome et le core-génome, respectivement. En général, le core-génome des bactéries lactiques apparait supérieur à 1000 gènes. On en compte 1276 chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Hao *et al.*, 2011), 1449 chez *Lactobacillus sakei* (Nyquist *et al.*, 2011), 1715 chez *Lactobacillus casei* (Broadbent *et al.*, 2012) et 1915 chez *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (Tan-a-ram *et al.*, 2011).

Suite à ces travaux, nous disposons au laboratoire d'une collection de souches caractérisées génétiquement et phénotypiquement. A partir de ces données, nous avons pu tenté de rechercher l'existence d'une corrélation entre les groupes génétiques A et B et les propriétés technologiques. Aucune différence significative a été mise en évidence quelque soit la variable étudiée. Cependant, on note que la majorité des levains malolactiques appartiennent au groupe A, à l'exception, à notre connaissance, de trois souches commerciales Expertise C, B1 et MCW4 (Bihère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010 ; Borneman *et al.*, 2012a). On remarque également que toutes les souches du groupe B ont présenté des capacités fermentaires plutôt médiocres, à l'exception de la souche S13 récemment isolée. On ne peut cependant pas conclure avec évidence sur l'existence ou l'absence de corrélation entre les groupes génétiques et les propriétés phénotypiques ; ceci pour deux raisons : le nombre limité de souches appartenant au groupe B au sein de notre collection et la présence de cinq souches de " laboratoire " dont trois conservées depuis plus de dix années au laboratoire. Or, toutes ces souches ont présenté des cinétiques fermentaires particulières avec une durée de FML active longue suggérant pour certaines une diminution ou une perte des propriétés technologiques au cours de la conservation en laboratoire. Ces résultats restent tout de même en accord avec de nombreux travaux qui ont aussi recherché ce type



de corrélation chez *O. oeni*. Quelque soit la technique de typage moléculaire utilisée et le phénotype étudié, aucune corrélation évidente n'a été décrite (Guerrini *et al.*, 2003 ; Cappello *et al.*, 2008 ; Cappello *et al.*, 2010 ; Bridier, 2011). Capello *et al.* (2008 ; 2010) ont mis en évidence uniquement une corrélation partielle entre l'activité malolactique et les sous-groupes génétiques observés. D'après certains travaux, les groupes génétiques de l'espèce *O. oeni* semblent plutôt liés à une niche écologique ou à une origine géographique (Guerrini *et al.*, 2003 ; Bilhère, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010 ; Claisse and Lonvaud-Funel, 2012).



## **CHAPITRE 3**

**Applications technologiques : sélection de  
souches d'intérêt industriel**



## 1. Sélection de souches d'intérêt industriel

### 1.1. Isolement de souches candidates

Dans le cadre de cette étude, des souches d'*O. oeni* d'intérêt œnologique ont été recherchées à partir d'échantillons de vins collectés principalement au cours de la FML lors des campagnes de vinification 2008 et 2009. Un total de 34 échantillons a été analysé. Ils provenaient de vins rouges ou blancs réalisés dans des conditions particulières de vinification (FML en bouteille, FML après addition de SO<sub>2</sub>, pH acide (<3,3), teneur en alcool élevée (>14%) ou températures basses (<18°C)) et récoltés dans différentes régions du bordelais, ainsi que dans le Val de Loire, en Bourgogne et en Angleterre.

Après étalement et purification sur milieu solide, un total de 43 clones a été isolé et caractérisé. Ils ont été typés par PCR spécifique de l'espèce *O. oeni* (OO1-OO2, Divol *et al.*, 2003) ou par séquençage de l'ADNr 16S (BSF8-BSR1541), ce qui a permis d'identifier 20 *O. oeni* et 7 lactobacilles (5 *L. plantarum* et 2 *L. hilgardii*) qui ont été déposés dans la collection SARCO. Par la suite, seuls les clones d'*O. oeni* ont été analysés. Une première discrimination par PCR RAPD multiplex Coc-On2 (Reguant and Bordons, 2003) a été réalisée afin de rejeter les isolats redondants originaires d'un même échantillon de vin. Deux clones similaires à ceux nommés S15 et S20 ont été exclus. 18 clones ont donc été retenus pour le travail de sélection, chacun provenant d'un échantillon de vin différent.

Par la suite, l'ensemble de ces 18 isolats a été analysé et comparé à 15 souches de laboratoire et 11 levains malolactiques comme décrit dans les chapitres 1 et 2 de la section " Résultats et discussion ". Le dendrogramme construit à partir des profils de restriction NotI-PFGE a permis de répartir 38 et 6 souches d'*O. oeni* dans les groupes génétiques A et B de l'espèce, respectivement (Chapitre 2, Figure 38). Seuls les isolats S12 et S13 se placent dans le groupe B. D'après l'origine des souches et les résultats des différents typages moléculaires (Apal-PFGE, Sfil-PFGE, MLST), toutes les souches ont été discriminées, à l'exception de S20 et S29 qui seraient deux isolats d'une même souche, et de S18, qui semble correspondre au levain malolactique 350 Preac. De ce fait, l'isolat S18 n'a pas été retenu pour le travail de sélection, qui a été basé finalement sur l'analyse de 17 souches.



## 1.2. Sélection génétique

Parmi les critères retenus pour la sélection des levains malolactiques, l'absence de métabolisme pouvant conduire à des altérations du vin est essentielle. Certaines souches d'*O. oeni* peuvent altérer les vins en produisant des amines biogènes telles que l'histamine, la tyramine ou la putrescine (Lucas *et al.*, 2008 ; Coton *et al.*, 2010). Nous avons testé par PCR, l'ensemble des souches nouvellement isolées pour déterminer si elles possédaient les gènes impliqués dans leur production. Les amorces de PCR utilisées étaient spécifiques des voies histidine décarboxylase (histamine) (oeniHDC2-HDC3), tyrosine décarboxylase (tyramine) (TDC2-TDC5), agmatine déiminase (putrescine) (PTC1-PTC2) et ornithine décarboxylase (putrescine) (ODC1-ODC2) (Coton *et al.*, 2010). Les voies de production de l'histamine et de la putrescine à partir d'agmatine n'ont été détectées chez aucune des nouvelles souches. Au contraire, la voie de l'ornithine décarboxylase a été mise en évidence chez la souche S22, qui pourrait donc produire de la putrescine à partir d'ornithine. De plus, les souches S4 et S19 présentent la voie tyrosine décarboxylase et pourraient donc produire de la tyramine. A ce jour, très peu de souches d'*O. oeni* possédant cette voie ont été rapportées dans la littérature, et la séquence des gènes impliqués n'a pas encore été publiée pour une souche de cette espèce. Le séquençage du génome de S19 est actuellement en cours et devrait permettre d'identifier cette voie chez *O. oeni* pour la première fois.

Le caractère filant du vin est une altération liée à la synthèse de bêta-glucanes par certaines souches de *Pediococcus parvulus* (Dols-Lafargue *et al.*, 2008). Même si aucune souche d'*O. oeni* n'a été mise en cause lors d'une altération de ce type jusqu'à aujourd'hui, certaines d'entre elles possèdent le gène d'une glycosyltransférase qui permet la synthèse des glucanes. Le gène codant la glycosyltransférase a été recherché par PCR (PF1-PF8) parmi les nouvelles souches de cette étude, mais il n'a été détecté chez aucune d'entre-elles.

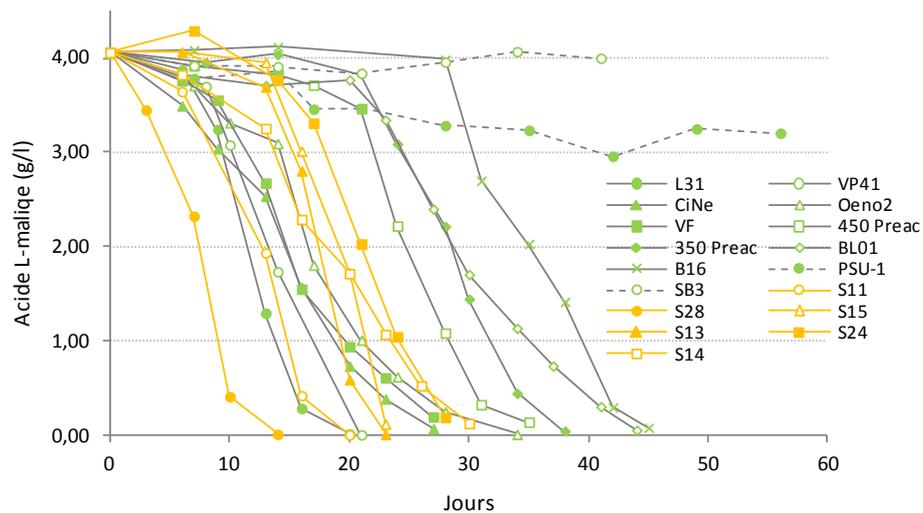
Le carbamate d'éthyle classé parmi les " agents probablement cancérigènes pour l'homme " est produit dans le vin à partir de l'urée formée par les levures, ou à partir de la citrulline formée par certaines souches d'*O. oeni* au cours du métabolisme de l'arginine (voie de l'arginine déiminase) (Mira de Orduna *et al.*, 2000). Ce métabolisme n'est pas considéré comme une source d'altération, en raison des faibles concentrations de carbamate d'éthyle qu'il génère. Néanmoins, nous avons recherché si les souches d'*O. oeni* étudiées possédaient



ou non le gène de l'arginine déiminase (ADIOO3'-ADIOO5') (Divol *et al.*, 2003). Seuls cinq d'entre elles ne possèdent pas ce gène (S18, S19, S23, S24 et S25).

### 1.3. Choix d'un protocole de sélection phénotypique

Le protocole élaboré pour la caractérisation des propriétés technologiques des 44 souches d'*O. oeni* (Chapitre 2) nous a également permis de réaliser un travail de sélection des souches selon leurs propriétés technologiques. Ce protocole était classique dans le sens où il a consisté à comparer les capacités des souches à réaliser la FML dans un vin. Néanmoins, il était original dans la mesure où les souches ont été comparées seulement après les avoir produites sous forme lyophilisée, comme le sont la plupart des levains malolactiques lors de leur commercialisation et de leur utilisation. La lyophilisation est une étape essentielle dont peuvent dépendre les propriétés technologiques des souches. Pourtant, elle n'a jamais été une priorité dans les travaux de sélection publiés jusqu'à aujourd'hui. Ces travaux ont généralement comparé les capacités fermentaires de souches produites dans des milieux de laboratoire et omis de tester la résistance à la lyophilisation, ou bien ils n'ont mesuré ce paramètre qu'après avoir sélectionné les souches (Guzzon *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010 ; Solieri *et al.*, 2010). Nous avons jugé important de tester les souches directement sous cette forme pour être plus proche des conditions qu'elles rencontrent lorsqu'elles sont produites industriellement et utilisées. Cette approche avait également été employée par d'autres auteurs lors des tous premiers travaux de sélection (Nielsen *et al.*, 1996), ou plus récemment lors de la mise en place d'un protocole de sélection rapide basé sur la mesure de l'expression de la protéine Lo18 (Coucheney *et al.*, 2005b). Pour comparer les capacités fermentaires des souches, nous avons choisi de les inoculer dans le vin directement, sans étape d'acclimatation, car comme il a été décrit précédemment (Chapitre 2, Figure 39), l'inoculation après une étape d'acclimatation améliore les cinétiques fermentaires et atténue les différences mesurées entre les souches. Le vin modèle préparé pour les tests fermentaires présentait des paramètres œnologiques conventionnels (pH 3,6, 12% éthanol, 4 g/l acide L-malique) et certaines caractéristiques peu favorables aux bactéries : une présence limitée de nutriments obtenue par filtration et élimination des levures après FA et la présence d'acides gras produits par la souche de levure utilisée qui peuvent inhiber la croissance de certaines souches bactériennes.



**Figure 50. Sélection des souches de la collection présentant les meilleures cinétiques fermentaires.**

Les cinétiques FML présentées ici sont issues de la caractérisation phénotypique précédemment décrite dans le chapitre 2 de la section " Résultats et discussion ". L'ensemble des souches ont été lyophilisées, inoculées après simple réhydratation à  $10^7$  cellules/ml dans un vin modèle préparé au laboratoire à partir de jus de raisin rouge commercial (pH 3,6 ; TAV 12% ; acide L-malique 4 g/l). Les isolats S11, S13, S15, S24 et S28 présentant une durée de FML inférieure à 30 jours (orange) ont été comparés aux 11 souches commerciales de la collection (vert). Les résultats correspondent à la moyenne d'expériences réalisées en duplicata.

#### 1.4. Sélection phénotypique, au laboratoire

Les 17 souches ont été testées en microvinification après inoculation directe des lyophilisats à  $10^7$  cellules/ml dans le vin modèle décrit ci-dessus. Elles ont été comparées à 11 levains malolactiques commercialisés par 7 sociétés et 15 souches de "laboratoire". Toutes ces souches ont été préparées et testées dans les mêmes conditions. L'ensemble des résultats a été présenté dans le chapitre 2 de la section "Résultats et discussion". Le principal critère de sélection des souches a été leur capacité à dégrader l'acide malique rapidement et complètement. Nous avons vu précédemment que l'ensemble des souches de "laboratoire" présentait des capacités fermentaires médiocres. La comparaison des nouveaux isolats et des levains malolactiques a montré que toutes ces souches présentent d'importantes différences en termes de cinétique de fermentation. Parmi les 17 isolats, six ont terminé la FML en 30 jours ou moins : S28 (14 jours), S11 (20 jours), S13 et S15 (23 jours), S24 (28 jours) et S14 (30 jours) (Figure 50). Seulement quatre des 11 levains malolactiques ont montré des cinétiques comparables (L31, VP41, VF, CiNe). Sur la base de ces résultats, il a été convenu de retenir les six nouvelles souches les plus performantes issues de ces essais pour poursuivre leur caractérisation et leur sélection, à savoir : S11, S13, S14, S15, S24 et S28.

#### 1.5. Sélection par des tests de vinification en conditions réelles

Des essais supplémentaires ont été menés en collaboration avec l'équipe SARCO sur les six souches retenues au laboratoire. Elles ont été comparées à quatre levains malolactiques commercialisés par les sociétés LAFFORT (350 Preac, 450 Preac), Lallemand (PN4, (Guzzon *et al.*, 2009)) et Martin-Vialatte (VF). Les nouvelles souches ont toutes été produites sous forme lyophilisée en quantité suffisante pour inoculer plusieurs hectolitres de vin. Certains essais ont été menés en laboratoire lors de nouvelles microvinifications. Dans ce cas, les lyophilisats ont été réhydratés dans de l'eau distillée stérile et inoculés à  $10^7$  cellules/ml dans 3 différents vins récoltés dans différents châteaux du Bordelais : un vin blanc acide (pH 3,2) de Sauvignon blanc, un vin de Merlot riche en polyphénols (indice de polyphénols totaux = 94) et riche en alcool (TAV = 15,3%) et un moût de Merlot utilisé dans un essai de co-inoculation avec des levures. Un autre essai a été réalisé en conditions réelles

**Tableau 19. Bilan des essais menés en laboratoire et sur le terrain pour la sélection de nouvelles souches oenologiques.**

	Vin modèle	Vin blanc A	Vin de Merlot B	Vin de Merlot C	Moût de Merlot D
<b>Principales caractéristiques</b>					
TAV ou TAP (%)	12,2	12,6	15,3	14,7	13,8
pH	3,6	3,2	3,48	3,55	3,55
Acide L-malique (g/l)	4,06	1,94	1,68	0,88	1,38
Taux d'inoculation (cellules/ml)	10E+07	10E+07	10E+07	10E+07	10E+07
Mode d'inoculation	Séquentielle	Séquentielle	Séquentielle	Séquentielle	Co-inoculation
Conditions	Microvinification	Microvinification	Microvinification	FML en barriques	Microvinification
<b>Population viable à 48h (cellules/ml)</b>					
S11	3,8E+06	4,5E+05	6,6E+05	1,4E+06	1,2E+06
S24	1,2E+05	7,5E+03	3,0E+02	3,0E+01	3,0E+05
S28	1,9E+07	2,3E+07	4,2E+05	5,0E+05	1,1E+06
350 Preac	4,7E+06	8,1E+05	3,1E+05	3,0E+06	2,0E+06
450 Preac	3,5E+06	4,2E+03	7,0E+04	1,0E+03	2,0E+05
VF	4,7E+06	1,7E+05	3,2E+05	3,0E+04	7,0E+05
PN4	NA	1,6E+05	NA	9,0E+05	NA
<b>Durée de la FML (jour)</b>					
S11	20	29	28	30	16
S24	28	45	ND	ND	30
S28	14	20	24	21	16
350 Preac	38	32	33	21	24
450 Preac	35	45	>42	-	28
VF	27	32	24	-	24
PN4	NA	18	NA	21	NA

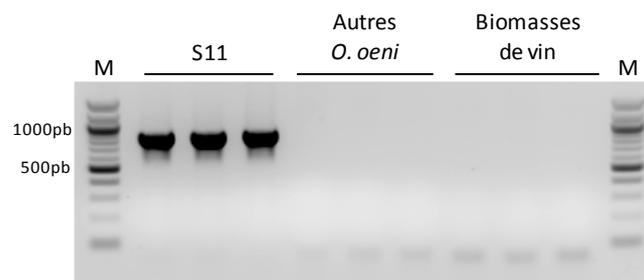
NA, non analysé ; -, absence d'un début de fermentation.

au Château Olivier (Pessac-Léognan). Dans ce cas, les souches ont été acclimatées selon le protocole Preac® de la société LAFFORT, qui consiste à réhydrater les souches lyophilisées dans le vin dilué au demi avec de l'eau et additionné d'Energizer®, composé essentiellement d'extraits de levures. Puis, après 12 heures, la préparation estensemencée dans le vin, soit l'équivalent d'une inoculation à  $10^6$  cellules/ml, pour mener des FML en barriques. Le suivi des FML ainsi que le dénombrement des cellules viables 48h après l'inoculation ont été réalisés par l'équipe SARCO.

Lors des essais en laboratoire, les souches S13, S14 et S15 n'ont pas été jugées satisfaisantes car leur taux de survie était toujours inférieur à  $10^3$  cellules/ml. Par conséquent, les FML n'ont pas été suivies pour ces trois souches et ne sont pas présentées dans le Tableau 19. Comme il a été observé dans le vin modèle, la population de cellules viables de la souche S24 a chuté considérablement 24h après inoculation lors des FML conduites après la FA (Tableau 19). Des populations inférieures à  $10^3$  cellules/ml ont notamment été déterminées dans les deux vins de Merlot. Ceux-ci sont souvent riches en polyphénols inhibiteurs de la croissance bactérienne (Garcia-Ruiz *et al.*, 2011). Pour ces deux essais, la FML n'a pas été suivie. Malgré une survie médiocre, la souche S24 a terminé la FML dans le vin blanc acide ou dans l'essai de co-inoculation, mais en général, il lui a fallu plus de temps que pour les autres souches.

Au contraire, les souches S11 et S28 ont montré de bonnes performances dans tous ces essais, comme cela avait été le cas dans le vin modèle (Tableau 19). Leurs capacités d'adaptation aux différentes conditions se sont traduites par une chute modérée de la population 24h après inoculation et par une phase de latence courte (inférieure à 7 jours). En inoculation séquentielle, les souches S11 et S28 ont terminé la FML dans des temps relativement courts et constants (en moyenne 29 et 22 jours, respectivement). Dans ces mêmes conditions, les durées de fermentation des levains 350 Preac, 450 Preac et VF étaient plus variables. Par exemple, la souche VF a réalisé la FML en 32 et 24 jours dans le vin blanc et un vin de Merlot, respectivement, et ne l'a pas débuté en conditions réelles de vinifications (FML en barriques).

Concernant la co-inoculation, il est noté une nette amélioration des cinétiques fermentaires pour l'ensemble des souches, probablement liées aux conditions moins



**Figure 51. PCR spécifique de la souche S11.** Les amorces dessinées ciblent un amplicon de 831pb sur le gène codant une enzyme de restriction. Aucun signal n'a été obtenu pour les 44 souches d'*O. oeni* et les 30 ADN extraits de biomasses de vin en FML. M, marqueur de poids moléculaire.

difficiles du milieu au moment de l'inoculation (disponibilité des sucres et nutriments, taux d'alcool très bas, peu de composés inhibiteurs liés à la croissance des levures). Là encore, les souches S11 et S28 ont été les plus performantes. D'après l'ensemble de ces résultats, il a été conclu que ces deux souches sont de bons candidats pour être utilisés comme levains malolactiques.

## 1.6. Mise en place d'une méthode de contrôle d'implantation rapide

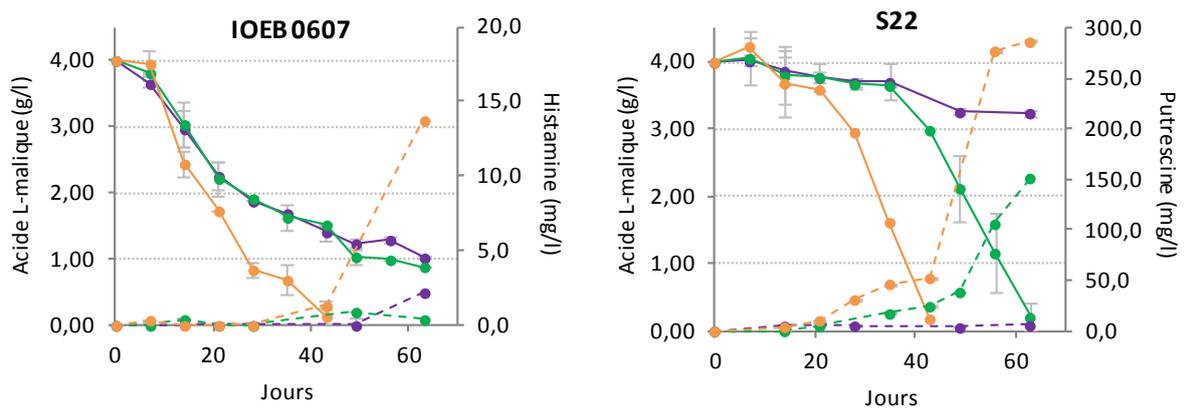
Le contrôle d'implantation des levains malolactiques est aujourd'hui peu réalisé, car il repose sur la technique d'électrophorèse en champ pulsé qui est fastidieuse, non quantitative et coûteuse. En utilisant les séquences des génomes des souches S11 et S28 qui présentent un intérêt technologique, nous avons tenté de mettre en place des tests de PCR spécifiques de ces souches, afin de faciliter leur détection et quantification dans les vins. Cette démarche se révèle d'autant plus utile pour S11 qui ne présente pas de profil NotI-PFGE.

Dans un premier temps, l'outil SeedViewer de RAST a été utilisé pour comparer les génomes des deux souches S11 et S28 sur la base des fonctions et/ou des séquences afin de mettre en évidence des ORFs spécifiques de chacune. Puis, chaque cible potentielle identifiée (3 et 12, respectivement) a été recherchée par Blast sur les 19 autres génomes annotés par RAST. Finalement, aucune des séquences identifiées chez S28 avec cette méthode ne lui sont spécifiques. Par contre, les trois ORFs co-localisées sur le génome de S11 et codant une ADN méthyltransférase, une endonucléase et une enzyme de restriction n'ont été détectées dans aucun autre génome. De plus, une analyse Blastn dans les banques de données publiques n'a révélé que des séquences nucléotidiques avec de faibles pourcentages de similarités. Une PCR spécifique du gène ciblant l'enzyme de restriction a donc été mise au point et sa spécificité a été confirmée en la testant sur les ADN génomiques des 44 souches d'*O. oeni* et sur des ADN extraits de biomasses de 30 vin collectés au cours de FML spontanées. Aucune amplification n'a été détectée avec tous ces ADN, à l'exception de celui de la souche S11 (Figure 51). Cette cible semble donc être un bon candidat pour développer un contrôle d'implantation de la souche S11. Il est important de noter que le gène ciblé comme les deux autres spécifiques de S11 fait partie d'un prophage



et pourrait donc être instable. Toutefois, tous les isolats S11 analysés au cours de cette thèse ont toujours porté ce gène.

D'après ces résultats, il peut être envisagé de réaliser un contrôle d'implantation semi-quantitatif de la souche S11, en analysant plusieurs colonies par cette PCR spécifique, comme est réalisé actuellement le contrôle d'implantation des levures sèches actives. Cependant, ce protocole nécessiterait une étape de culture sur milieu solide qui est relativement longue (7-10 jours). Pour pallier à ce problème, le développement d'une PCR quantitative spécifique de la souche S11 est envisagé. D'autres recherches bioinformatiques pourraient peut-être permettre d'identifier de nouvelles cibles pour d'autres souches et notamment pour les autres levains malolactiques.

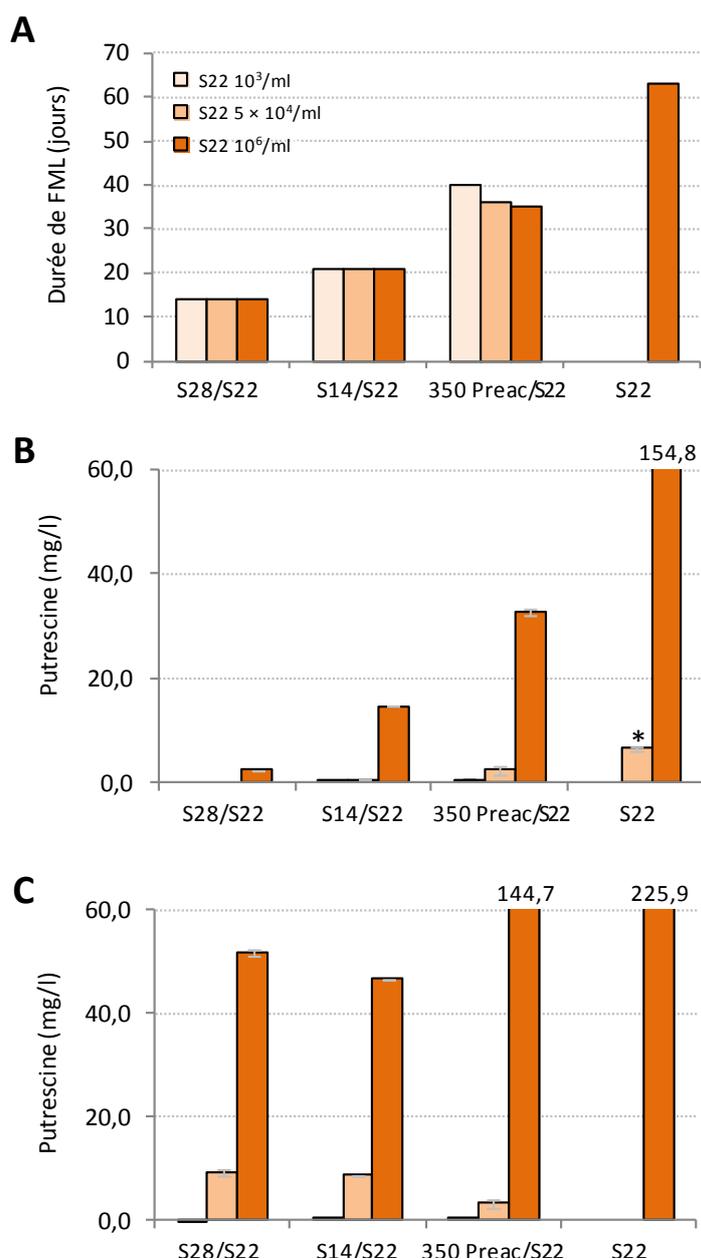


**Figure 52. Capacités des souches IOEB 0607 et S22 à produire des amines biogènes au cours de FML menées à différents pH.** La dégradation de l'acide L-malique (trait continu) et la production d'amines biogènes (trait discontinu) ont été suivis en parallèle durant 60 jours dans le vin modèle ajusté à pH 3,3 (violet), pH 3,6 (vert) et pH 3,9 (orange). Les cinétiques correspondent à la moyenne de deux expériences.

## 2. Impact des levains malolactiques sur les bactéries d'altération

Les levains malolactiques sont utilisés pour améliorer la maîtrise du démarrage et de la durée de la FML, mais aussi pour éviter le développement des microorganismes d'altération. Ils permettent notamment de limiter le développement des bactéries productrices d'amines biogènes (Nannelli *et al.*, 2008). Au cours des travaux réalisés pendant cette thèse, nous avons mesuré les cinétiques fermentaires de plusieurs dizaines de souches produites et testées dans les mêmes conditions que les levains malolactiques du commerce, ce qui nous a permis d'identifier un panel de souches présentant des cinétiques fermentaires très différentes. Nous avons recherché si ces différences de cinétique de fermentation pouvaient avoir un impact sur le développement des bactéries d'altération pendant la FML. Pour cela, nous avons utilisé trois souches capables de réaliser la FML en 14 jours (S28), 30 jours (S14) et 38 jours (350 Preac) dans le vin modèle. Comme témoin d'altération, nous avons testé deux souches productrices d'amines biogènes : S22 et IOEB 0607, qui produisent de la putrescine et de l'histamine, respectivement.

Des essais préliminaires ont été réalisés pour savoir si les souches S22 et IOEB 0607 étaient capables de mener la FML et de produire les amines biogènes correspondantes dans différentes conditions de pH (3,3 ; 3,6 ; 3,9). Lors des précédents essais sur le vin modèle, la souche S22 n'a pas débuté la FML. Nous avons donc choisi d'inclure au protocole une étape d'acclimatation pour assurer l'implantation des souches dans le vin enrichi en ornithine ou histidine à 0,5 g/l. La FML et la production d'amines biogènes (dosées par chromatographie sur couche mince, Romano *et al.*, 2012) ont été suivies en parallèle durant 60 jours (Figure 52). Dans ces conditions, les deux souches ont menés des FML relativement longues (>40 jours) même au pH le plus élevé (3,9), dénotant des capacités fermentaires médiocres. On note l'influence du pH à la fois sur la durée de FML et sur la production d'amines biogènes. La souche IOEB 0607 a commencé à produire de l'histamine (13,8 mg/l) en fin de fermentation et uniquement pour la condition à pH 3,9. Pour les autres pH similaires à celui du vin, les FML ont été languissantes et aucune production d'histamine n'a été détectée. A pH acide (3,3), la souche S22 n'a pas été capable de débiter la FML et n'a pas produit de putrescine, alors qu'aux pH 3,6 et 3,9, des traces de putrescine ont été mesurées dès le début de la FML, pour atteindre en fin de fermentation 152 et 52,6 mg/l de putrescine dans



**Figure 53. Impact des durées de FML sur la production de putrescine. (A)** Durée des FML, **(B)** Teneurs en putrescine à la fin de la FML, **(C)** Teneurs en putrescine 4 semaines après la fin de la FML. La souche S22 productrice de putrescine a été ensemencée à différents niveaux de population  $10^3$ ,  $5 \times 10^4$  et  $10^6$  cellules/ml en co-inoculation avec trois différentes souches S14, S28 ou 350 Preac ensemencée à  $10^6$  cellules/ml dans le vin modèle enrichi en ornithine à 0,5 g/l. Toutes les souches ont été acclimatées avant inoculation. La teneur initiale en putrescine a été évaluée à 2,8 mg/l, cette valeur a été retirée aux résultats présentés, moyennes de deux expériences. Aux faibles niveaux de population, la souche S22 n'a pas débuté la FML, l'astérisque indique une production de putrescine mesurée à 63 jours, en absence de FML.

le vin, respectivement. Il a également été remarqué que la production d'amines biogènes se poursuit après la FML, comme observé pour la souche S22 à pH 3,9.

La souche S22 a donc été choisie pour évaluer l'impact des cinétiques fermentaires sur la production d'altération car elle produit de la putrescine par la voie de l'ornithine décarboxylase dans les conditions œnologiques testées. Elle a été inoculée à différents niveaux de population ( $10^3$ ,  $5 \times 10^4$  et  $10^6$  cellules/ml) dans le vin modèle enrichi en ornithine (0,5 g/l), seule, ou en présence des souches S14, S28 ou 350 Preac inoculées à  $10^6$  cellules/ml. Les cinétiques de fermentation ont été conformes à nos attentes (Figure 53A). Les souches S28 et 350 Preac ont terminé la FML en 14 et 35-40 jours, respectivement, comme dans le vin modèle. Liée à l'étape d'acclimatation, la durée de FML a été réduite à 21 jours pour la souche S14 qui est sensible à l'inoculation directe. Lorsqu'elle a été inoculée seule à  $10^3$  ou  $5 \times 10^4$  cellules/ml, la souche S22 n'est pas parvenue à déclencher la FML au bout de 50 jours, mais elle a tout de même produit jusqu'à 7 mg/l de putrescine (Figure 53B). A une population de  $10^6$  cellules/ml, elle a terminé la FML en 63 jours et a produit 155 mg/l de putrescine. Lors des essais de co-inoculation de la souche S22 à  $10^3$  ou  $5 \times 10^4$  cellules/ml et d'un levain malolactique, de très faibles concentrations de putrescine (<5 mg/l) ont été détectées à la fin de la FML, quelle que soit la durée de fermentation (S28, 14 jours ; S14, 21 jours ; 350 Preac, 37 jours). Lorsque la souche S22 était initialement présente à  $10^6$  cellules/ml, une production de putrescine a été observée quel que soit le levain co-inoculé, mais proportionnellement à la durée de la FML. Les concentrations les plus faibles ont été mesurées lors des co-inoculations avec les souches S28 (5,2 mg/L) et S14 (17,5 mg/l), alors que près de 35,6 mg/l de putrescine a été produite en présence du levain 350 Preac. Par conséquent, l'utilisation des levains malolactiques permet bien de réduire la quantité de putrescine produite pendant la FML. Il est possible qu'ils inhibent le développement des bactéries d'altération lorsqu'elles sont présentes à des niveaux de populations relativement modérés (<  $10^4$ /ml), mais leur action est uniquement liée à la réduction de la durée de la FML lorsque la contamination par les bactéries d'altération est importante ( $10^6$ /ml).

Pour déterminer si les levains malolactiques ont eu un impact sur la population de S22, les vins obtenus lors des co-inoculations ont été conservés pendant quatre semaines sans addition de sulfites à compter de la fin de la FML. Cette période finie, les teneurs en putrescine ont été déterminées (Figure 53C). Excepté les vins inoculés avec S22 à  $10^3$ /ml, la



production de putrescine a continué après la FML, quel que soit le niveau de population de la souche d'altération et quel que soit le levain co-inoculé. A  $10^6$  cellules/ml, la souche S22 seule a produit jusqu'à 225 mg/l de putrescine. En présence des levains, de fortes concentrations ont également été détectées, notamment lorsque la FML a été relativement longue comme pour 350 Preac. Quatre semaines après la FML qui a duré 35 jours, S22 a produit tout de même 144,7 mg/l de putrescine.

En conclusion, les levains malolactiques inhibent bien la production de putrescine pendant la FML en raison de la réduction de la durée de la FML, mais pas par un mécanisme d'inhibition de la croissance de la souche S22. Après la FML, sans addition de sulfites, cette bactérie peut continuer à métaboliser l'ornithine et à produire de la putrescine.



### 3. Discussion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont abouti à plusieurs applications technologiques. Tout d'abord, la collection SARCO a été enrichie par de nouvelles souches caractérisées d'un point de vue génétique et phénotypique. Le protocole de caractérisation des propriétés technologiques reste classique mais son originalité repose sur un critère peu étudié et pourtant essentiel lors de la sélection de souches d'intérêt industriel (Torriani *et al.*, 2010 ; Grześkowiaka *et al.*, 2011 ; Nivoliez *et al.*, 2012). Les souches ont d'abord été préparées sous forme lyophilisée puis leurs propriétés œnologiques ont été étudiées lors d'une même expérience, à la différence de la plupart des autres travaux de sélection qui prennent peu en compte ce critère. Grâce à ce protocole, certaines souches ont été sélectionnées pour leurs propriétés œnologiques et pourraient être commercialisées par la société LAFFORT. Elles ne produisent pas d'altérations, résistent au procédé de production industrielle et à l'inoculation dans le vin, sont efficaces lors des fermentations menées en laboratoire et sur le terrain, et de ce fait permettent la réduction des altérations liées notamment aux bactéries indigènes productrices d'amines biogènes. Nous avons vu en effet l'importance des cinétiques de fermentation quant à la teneur en amines biogènes des vins en fin de FML. Des fermentations rapides et complètes permettent de limiter considérablement la production d'altérations. Par contre, les populations indigènes n'étant pas ou peu inhibées par l'addition de levains, la stabilisation microbiologie du vin à la fin de la FML reste indispensable pour maîtriser la production d'altération associée à ces populations (Jiménez Moreno *et al.*, 2003 ; Marcobal *et al.*, 2006).

Deux des nouvelles souches caractérisées, S11 et S28, ont été particulièrement intéressantes à la fois sur le plan technologique mais également sur le plan génétique. En effet, elles contiennent également les gènes d'intérêt détectés sur les trois régions génomiques variables œnologiques associées aux capacités d'adaptation au vin des souches d'*O. oeni* ; la souche S11 porte aussi le plasmide pOENI-1v2 avec les gènes *oye* et *tauE*, un plasmide stable qui n'a pas été perdu en condition de laboratoire. Depuis un an, la souche S28 est commercialisée sous le nom B28 Preac, elle est produite facilement à l'échelle industrielle (rendement moyen de 41 g/l équivalent à celui du levain 350 Preac) à la différence des résultats obtenus en laboratoire (rendement de 1,7 g/l). La souche S11 est



toujours en cours de caractérisation et pourrait être commercialisée dans les années à venir. De plus, un contrôle d'implantation semi-quantitatif basé sur la PCR sur colonies comme celui réalisé pour les levures est disponible pour cette souche qui ne présente pas de profil NotI-PFGE. Il est envisagé de rechercher s'il est possible de développer des contrôles d'implantation basés sur la PCR quantitative pour cette souche ainsi que pour les autres levains malolactiques.



# **CONCLUSION GENERALE**



*Oenococcus oeni* est connue comme la bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique du vin. A quelques exceptions près, seules des souches de cette espèce sont recherchées lors de la sélection des levains malolactiques. Dans la mesure où ces souches présentent une grande diversité phénotypique, les travaux de sélection visent à identifier les souches les plus performantes capables de mener des FML rapides et complètes dans différents types de vin. Les connaissances actuelles sur la diversité génétique des souches d'*O. oeni* et sur les gènes impliqués dans l'adaptation au vin ne sont pas encore suffisantes pour envisager la sélection des levains malolactiques par des approches génétiques. Depuis les années 1960 et jusqu'à aujourd'hui, tous les travaux de sélection sont donc principalement basés sur des méthodes empiriques d'analyse des phénotypes. C'est dans ce contexte que les travaux présentés dans cette étude ont été réalisés. L'objectif a été d'identifier les caractéristiques génétiques des souches d'intérêt technologique à travers l'étude des plasmides et génomes d'*O. oeni*.

Les plasmides sont des éléments fréquents chez les bactéries lactiques, où ils sont susceptibles de conférer des propriétés technologiques à leurs hôtes. Néanmoins, ils sont encore peu connus chez *O. oeni*. Afin d'identifier des plasmides susceptibles de porter des gènes d'intérêt chez cette espèce, nous avons tenté de développer une technique de purification des grands plasmides chez *O. oeni*. Les résultats obtenus par une méthode combinant la lyse alcaline et le champ pulsé étaient encourageants ; ils ont permis de détecter de grands plasmides chez plusieurs souches. Cependant, les rendements d'extraction étaient encore trop faibles pour utiliser cette méthode en routine. Une approche plus prometteuse est le séquençage des génomes complets, qui permet, lorsqu'ils sont présents, d'identifier les séquences des plasmides.

Séquencé au laboratoire lors d'une thèse précédente, le plasmide pOENI-1 a été étudié plus particulièrement. Les travaux ont révélé l'existence d'au moins trois formes variantes de ce plasmide : pOENI-1, pOENI-1v2 et pOENI-1v3, que nous avons groupées dans la famille "pOENI-1". Ces plasmides ont des tailles d'environ 20kb. Ils utilisent un mécanisme de répllication de type thêta. Ils sont non conjugatifs, mais certains sont potentiellement mobilisables. Ils contiennent différents systèmes de maintenance et des gènes accessoires susceptibles de conférer un avantage adaptatif à la souche hôte, comme



les gènes *oye* et *tauE*. Cependant les essais menés en laboratoire n'ont pas permis de mettre en évidence un avantage adaptatif évident chez les souches hôtes. Néanmoins, les plasmides complets et les gènes *oye* et *tauE*, plasmidiques ou chromosomiques, ont été très fréquemment détectés chez les levains malolactiques et chez les souches d'*O. oeni* associées aux FML spontanées. Par conséquent, bien qu'aucun phénotype n'ait été associé aux plasmides lors des tests en laboratoire, il semble bien qu'ils pourraient participer à l'adaptation des souches d'*O. oeni* au milieu " vin ". Afin de préciser leur rôle, cette étude pourra être poursuivie par des mesures d'expression des gènes plasmidiques et par l'analyse fonctionnelle de la perméase TauE, de l'oxydoréductase de la famille OYE et des protéines " hypothétiques " codées par ces plasmides, pour lesquelles aucune annotation ne permet encore de prédire leurs fonctions.

Dans un second temps, nous avons recherché des gènes d'intérêt technologique en comparant les génomes de souches plus ou moins performantes. Pour cela, les propriétés technologiques (résistance à la lyophilisation, survie à l'inoculation dans le vin et capacités fermentaires) de diverses souches d'*O. oeni* ont été déterminées. Nous avons utilisé un protocole visant à lyophiliser les souches, puis à les tester sous cette forme dans un vin modèle. Comme attendu, une grande diversité phénotypique a été observée, même parmi les levains malolactiques. Cette diversité ne semble pas corrélée aux sous-populations génétiques A et B de l'espèce *O. oeni*.

Aujourd'hui, le séquençage des génomes est accessible à tous et permet de répondre à de nombreuses attentes scientifiques dans de multiples domaines. Dans notre cas, l'étude et la comparaison des génomes nous a permis de détecter des gènes spécifiques des souches d'intérêt technologique. La taille des génomes (1,74 à 1,92Mpb) et leur nombre d'ORFs (1799 à 2019) sont variables indiquant la présence de nombreuses séquences accessoires susceptibles de coder des fonctions d'intérêt. L'analyse des données obtenues a révélé 22 séquences corrélées à au moins un des phénotypes " d'intérêt technologique ". Elles sont localisées sur quatre régions de plasticité génomique qui portent des gènes d'intérêt pour la cellule dont certains sont probablement impliqués dans le transport et le métabolisme des sucres et des acides aminés.



Trois gènes chromosomiques *nqr*, *araC* et *xyl*, chacun appartenant à une région variable, et les deux gènes plasmidiques *oye* et *tauE*, ont été recherchés chez l'ensemble des souches caractérisées phénotypiquement, afin de valider, par des analyses statistiques, leur rôle comme marqueur génétique des souches d'intérêt technologique. Les gènes *araC* et *tauE* seuls ou combinés respectivement aux gènes *nqr* et *oye*, apparaissent comme de bons candidats pour la sélection des souches performantes. Les gènes *araC* et *nqr* sont plutôt présents chez les souches caractérisées par un bon rendement de production, une bonne capacité de survie à l'inoculation et une phase de latence courte, alors que les gènes *tauE* et *oye* sont associés aux souches menant des FML complètes et rapides. L'utilisation des courbes ROC nous a permis d'identifier ces gènes et de prédire les capacités technologiques des souches en fonction de leur présence ou absence.

Au cours de ces travaux, nous avons identifié deux nouvelles souches d'intérêt œnologique, S11 et S28, dont l'une est aujourd'hui commercialisée par la société LAFFORT. Nous pouvons également proposer une nouvelle approche de sélection des levains malolactiques basée sur la détection des gènes, comme *araC* et *tauE*, spécifiques des souches d'intérêt industriel, selon les prédictions des courbes ROC. Dans un futur proche, les données obtenues vont être complétées par l'analyse de nouveaux génomes de souches dont nous avons évalué les propriétés technologiques, ce qui permettra de confirmer et préciser les résultats décrits ici. Puis, il serait intéressant d'étudier plus précisément chaque région génomique mise en évidence, afin d'identifier précisément les gènes contribuant aux propriétés phénotypiques des souches et de définir leur rôle. Cela pourra être réalisé par l'analyse de l'expression des gènes et la détermination enzymatique du rôle des protéines codées.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Alegre, M.T., Rodriguez, M.C. and Mesas, J.M.** (1999) Nucleotide sequence analysis of pRS1, a cryptic plasmid from *Oenococcus oeni*. *Plasmid*. **41**, 128-134.
- Alegria, G., Lopez, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. and Ruiz-Larrea, F.** (2004) High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett*. **230**, 53-61.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L.** (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microb*. **46**, 549-52.
- Antalick, G.** (2010) Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique : Rôle particulier des esters. Thèse. Université de Bordeaux II.
- Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons, A. and Reguant, C.** (2009) Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem*. **57**, 1841-1847.
- Asteri, I.A., Papadimitriou, K., Boutou, E., Anastasiou, R., Pot, B., Vorgias, C.E. and Tsakalidou, E.** (2010) Characterization of pLAC1, a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus acidipiscis* and comparative analysis with its related plasmids. *Int J Food Microbiol*. **141**, 222-228.
- Athane, A., Bilhere, E., Bon, E., Morel, G., Lucas, P., Lonvaud, A. and Le Marrec, C.** (2008) Characterization of an acquired *dps*-containing gene island in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **105**, 1866-1875.
- Aziz, R., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Overbeek, R., McNeil, L., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. and Zagnitko, O.** (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*. **226**, 235-40.
- Bartowsky, E.J.** (2005) *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation; moving into the molecular arena. *Aust J Grape Wine R*. **11**, 174-187.
- Bartowsky, E.J. and Borneman, A.** (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol*. **92**, 441-447.
- Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A.** (2004) The 'buttery' attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol*. **96**, 235-252.
- Bauer, R and Dicks, L.M.T.** (2004) Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S AFR J Enol Vitic*. **25**, 74-88.
- Beelman, R.B., Gavin, A. and Keen, R.M.** (1977) A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in eastern wines. *Am J Enol Vitic*. **28**, 159-165.



- Bekaert, B., Coomans, M., Knaepen, K., Larno, L., Thijs, N., Vanhoutte, E., Wim Van de Voorde, Decorte, R.** (2009) Validation of a microchip electrophoresis system as a DNA amplification control *Forensic Science International*. **2**, 119-120.
- Beelman, R.B., McArdle, F.J. and Duke, G.R.** (1980) Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML-34 and PSU-1 to induce malo-lactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am J Enol Vitic.* **31**, 269-276.
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Marechal, R., Grandvalet, C. and Guzzo, J.** (2006) Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Res Microbiol.* **157**, 267-274.
- Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F. and Guzzo, J.** (2004) Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL locus expression in response to stress. *J Bacteriol.* **186**, 2200-2205.
- Besemer, J. and Borodovsky, M.** (2005) GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* **33**, 451-454.
- Bilhere, E.** (2009) Etude de la diversité génétique intraspécifique chez la bactérie lactique *Oenococcus oeni*. Thèse. Université de Bordeaux II.
- Bilhere, E., Lucas, P.M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2009) Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Appl Environ Microb.* **75**, 1291-1300.
- Bloem, A., Lonvaud-Funel, A. and de Revel, G.** (2008) Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* **25**, 99-104.
- Bon, E., Delaherche, A., Bilhere, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A. and Le Marrec, C.** (2009) *Oenococcus oeni* genome plasticity associated with fitness. *Appl Environ Microb.* **75**, 2079–2090.
- Borneman, A.R., Bartowsky, E.J., McCarthy, J. and Chambers, P.J.** (2010) Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol.* **86**, 681-691.
- Borneman, A., McCarthy, J., Chambers, P. and Bartowsky, E.** (2012a) Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics.* **13**, 373.
- Borneman, A.R., McCarthy, J.M., Chambers, P.J. and Bartowsky, E.J.** (2012b) Functional divergence in the genus *Oenococcus* as predicted by genome sequencing of the newly-described species, *Oenococcus kitaharae*. *PLoS One* **7**, e29626.
- Bourdineaud, J.P., Nehme, B., Tesse, S. and Lonvaud-Funel, A.** (2003) The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl Environ Microb.* **69**, 2512-2520.



- Bourdineaud, J.P., Nehmé, B., Tesse, S. and Lonvaud-Funel, A.** (2004) A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *Int J Food Microbiol.* **92**, 1-14.
- Bridier, J.** (2011) Etude de la diversité intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*: Relation entre variabilité phénotypique et diversité génétique. Thèse. Université de Bordeaux II.
- Bridier, J., Claisse, O., Coton, M., Coton, E. and Lonvaud-Funel, A.** (2010) Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the *Oenococcus oeni* species. *Appl Environ Microb.* **76**, 7754-7764.
- Brige, A., Van den Hemel, D., Carpentier, W., De Smet, L. and Van Beeumen, J.J.** (2006) Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function. *Biochem J.* **394**, 335-344.
- Brito, L. and Paveia, H.** (1999) Presence and analysis of large plasmids in *Oenococcus oeni*. *Plasmid.* **41**, 260-267.
- Brito, L., Vieira, G., Santos, M.A. and Paveia, H.** (1996) Nucleotide sequence analysis of pOg32, a cryptic plasmid from *Leuconostoc oenos*. *Plasmid.* **36**, 49-54.
- Broadbent, J.R., Neeno-Eckwall, E.C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath, P., Heidenreich, J., Perna, N.T., Barrangou, R. and Steele, J.L.** (2012) Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics.* **13**, 533.
- Campbell-Sills, H.** (2012) Variabilité génétique et adaptation au vin d'*Oenococcus oeni*. Mémoire de Master Recherche. Université de Bordeaux II.
- Campo, N., Dias, M., Daveran-Mingot, M.-L., Ritzenthaler, P. and Le Bourgeois, P.** (2002) Genome plasticity in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**, 123-132.
- Capozzi, V., Russo, P., Beneduce, L., Weidmann, S., Grieco, F., Guzzo, J. and Spano, G.** (2010) Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett Appl Microbiol.* **50**, 327-334.
- Cappello, M.S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A. and Zapparoli, G.** (2008) Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *Int J Food Microbiol.* **127**, 241-245.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Stefani, D. and Logrieco, A.** (2010) Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Syst Appl Microbiol.* **33**, 461-467.
- Carr, J. G. and Davies, P. A.** (1970) Homofermentative Lactobacilli of Ciders including *Lactobacillus mali*. *J Appl Microbiol.* **3**, 768-774
- Carreté, R., Reguant, C., Rozes, N., Constanti, M. and Bordons, A.** (2006) Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. *Am J Enol Vitic.* **57**, 356-362.



- Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A. and Constanti, M.** (2002) Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett.* **211**, 155-159.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P.** (2003) Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait.* **83**, 203-210.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P.** (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* **14**, 835-847.
- Cavin, J.F., Schmitt, P., Arias, A., Lin, J. and Divies, C.** (1988) Plasmid profiles in *Leuconostoc* species. *Microbiol Alim Nutr.* **6**, 55-62.
- Cecconi, D., Milli, A., Rinalducci, S., Zolla, L. and Zapparoli, G.** (2009) Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis.* **30**, 2988-2995.
- Chattoraj, D.K.** (2000) Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol.* **37**, 467-476.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.A. and Guzzo, J.** (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta.* **1717**, 118-124.
- Ciezack, G., Hazo, L., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud-Funel, A. and Dols-Lafargue, M.** (2009) Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *J Appl Microbiol.* **108**, 499-509.
- Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2012) Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* **30**, 340-347.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P. and Coton, E.** (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol.* **27**, 1078-1085.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Marechal, R., Dulau, L. and Guzzo, J.** (2005a) A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol.* **105**, 463-470.
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P. and Guzzo, J.** (2005b) A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim Biophys Acta.* **1720**, 92-98.
- Coulilaby, I., Dubois-Dauphin, R., Danthine, S., Majad, L., Mejoub, T., Destain, J., Béra, F., Wathelet, J.P. and Thonart, P.** (2011) Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *Biotechnol Agron Soc Environ.* **15**, 287-299.
- Da Silveira, M.G., Golovina, E.A., Hoekstra, F.A., Rombouts, F.M. and Abee, T.** (2003) Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microb.* **69**, 5826-5832.



- Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. and Fleet, G.H.** (1985) Practical implications of malolactic fermentation: A Review. *Am J Enol Vitic.* **36**, 290-301.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H. and Lee, T.H.** (1988) Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am J Enol Vitic.* **39**, 137-142.
- Delacour, H ., Servonnet, A., Perrot, A ., Vigezzi, JF. and Ramirez , J.M.**(2005) La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Ann Biol Clin.* **63**, 145-154.
- de Las Rivas, B., Marcobal, A. and Munoz, R.** (2004) Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7210-7219.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A. and Bertrand, A.** (1999) Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J Agric Food Chem.* **47**, 4003-4008.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R.** (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol R.* **62**, 434-464.
- Delaherche, A., Bon, E., Dupe, A., Lucas, M., Arveiler, B., De Daruvar, A. and Lonvaud-Funel, A.** (2006) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**, 394-403.
- Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O. and Salzberg, S.L.** (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4636-4641.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. and Collins, M.D.** (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **45**, 395-397.
- Dimopoulou, M., Hazo, L. and Dols-Lafargue, M.** (2012) Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *Int J Food Microbiol.* **153**, 114-122.
- Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E. and Lonvaud-Funel, A.** (2003) Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J Appl Microbiol.* **94**, 738-746.
- Dougherty, B.A., Hill, C., Weidman, J.F., Richardson, D.R., Venter, J.C. and Ross, R.P.** (1998) Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol Microbiol.* **29**, 1029-1038.
- Dressaire, C., Redon, E., Gitton, C., Loubiere, P., Monnet, V. and Coccagn-Bousquet, M.** (2011) Investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to isoleucine starvation integrating dynamic transcriptome and proteome information. *Microb Cell Fact.* **10**, S18.
- Driss, F., Tounsi, S. and Jaoua, S.** (2011) Relationship between plasmid loss and gene expression in *Bacillus Thuringiensis*. *Curr Microbiol.* **62**, 1287-1293.
- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. and Krieger-Weber, S.** (2011) *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an Overview. *Food Bioprocess Tech.* **4**, 876-906.



- Edwards, C.G., Jensen, K.A., Spayd, S.E. and Seymour, B.J.** (1991) Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington State wines. *Am J Enol Vitic.* **42**, 219-226.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E.C.** (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 7843–7853.
- El Gharniti, F., Dols-Lafargue, M., Bon, E., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Lonvaud, A. and Le Marrec, C.** (2012) IS30 elements are mediators of genetic diversity in *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol.* **158**, 14-22.
- Endo, A. and Okada, S.** (2006) *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol.* **56**, 2345-2348.
- Endo, A. and Okada, S.** (2007) *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 708-712.
- Fang, F., Flynn, S., Li, Y., Claesson, M.J., van Pijkeren, J.P., Collins, J.K., van Sinderen, D. and O'Toole, P.W.** (2008) Characterization of endogenous plasmids from *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microb.* **74**, 3216-3228.
- Farah, M.E. and Amberg, D.C.** (2007) Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell.* **18**, 1359-1365.
- Ferré, L.** (1922) Influence de la rétrogradation de l'acide malique sur la composition des vins blancs. *Ann Sc Agronomiques.* **5**.
- Field, C.M. and Summers, D.K.** (2011) Multicopy plasmid stability: Revisiting the dimer catastrophe. *J Theor Biol.* **291**, 119-127.
- Fitzpatrick, T.B., Amrhein, N. and Macheroux, P.** (2003) Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme homolog from *Bacillus subtilis* involved in the oxidative stress response. *J Biol Chem.* **278**, 19891-19897.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribereau-Gayon, P.** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl Environ Microb.* **48**, 1034-1038.
- Fremaux, C., Aigle, M. and Lonvaud-Funel, A.** (1993) Sequence analysis of *Leuconostoc oenos* DNA: organization of pLo13, a cryptic plasmid. *Plasmid.* **30**, 212-223.
- Friehs, K.** (2004) Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **86**, 47-82.
- Gagné, S., Lucas, P.M., Perello, M.C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. and de Revel, G.** (2010) Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J. Appl Microbiol.* **110**, 218-228.
- Garvie, E.I.** (1967) *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J Gen Microbiol.* **48**, 431-438.



- Gerdes, K., Rasmussen, P.B. and Molin, S.** (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci.* **83**, 3116-3120.
- Gindreau, E., Joyeux, A., de Revel, G., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (1997). Evaluation of the settling of malolactic starters within the indigenous microflora of wines. *J Int Sci Vigne Vin.* **31**, 197-202.
- Gotfredsen, M. and Gerdes, K.** (1998) The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol.* **29**, 1065-76.
- Grandvalet, C., Assad-Garcia, J.S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J. and Tourdot-Marechal, R.** (2008) Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfp* gene by heterologous complementation. *Microbiology.* **154**, 2611-2619.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C. and Guzzo, J.** (2005) CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J Bacteriol.* **187**, 5614-5623.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. and Jiranek, V.** (2005) A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol.* **105**, 233-244.
- Grohmann, E., Muth, G. and Espinosa, M.** (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol R.* **67**, 277-301.
- Grzeńkowiaka, L., Isolauria, E., Salminen, S. and Gueimondea, M.** (2011) Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *Brit J Nutr.* **105**, 887-894.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P. and Vincenzini, M.** (2003) Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol.* **83**, 1-14.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Granchi, L. and Vincenzini, M.** (2002a) Effect of oleic acid on *Oenococcus oeni* strains and malolactic fermentation in wine. *Curr Microbiol.* **44**, 5-9.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. and Vincenzini, M.** (2002b) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol.* **44**, 374-378.
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M.P., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J.F. and Divies, C.** (1997) A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett Appl Microbiol.* **24**, 393-396.
- Guzzon, R., Poznanski, E., Conterno, L., Vagnoli, P., Krieger-Weber, S. and Cavazza, A.** (2009) Selection of a new highly resistant strain for malolactic fermentation under difficult conditions. *S Afr J Enol Vitic.* **30**, 133-141.
- Hao, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Yu, Z., Ren, S., Oda, M., Konno, T., Wang, S., Li, X., Ji, Z.S. and Zhao, G.** (2011) Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. *PLoS One* **6**, e15964.



- Henick-Kling, T.** (1993) Malolactic fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 289-326.
- Henick-Kling, T., Sandine, W.E., and Heatherbell, D.A.** (1989) Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines. *Appl Environ Microb.* **55**, 2010-2016.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., de Castro, E., Coghill, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R.D., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., McMenemy, C., Mi, H., Mutowo-Muellenet, P., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Pesseat, S., Punta, M., Quinn, A.F., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Selengut, J.D., Sigrist, C.J.A., Scheremetjew, M., Tate, J., Thimmajananathan, M., Thomas, P.D., Wu, C.H., Yeats, C. and Yong, S.Y.** (2012) InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.* **40**, 306-312.
- Ito, Y., Kawai, Y., Arakawa, K., Honme, Y., Sasaki, T. and Saito, T.** (2009) Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasserii* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. *Appl Environ Microb.* **75**, 6340-6351.
- Jackowetz, J.N. and Mira de Orduña, R.** (2012) Metabolism of SO<sub>2</sub> binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *Int J Food Microbiol.* **155**, 153-157.
- Jacquemin, G.** (1897) Emploi rationnel des levures pures sélectionnées pour l'amélioration des vins. Ed Imprimeries nancéiennes.
- Janse, B.J.H., Wingfield, B.D., Pretorius, I.S. and van Vuuren, H.J.J.** (1987) Plasmids in *Leuconostoc oenos*. *Plasmid* **17**, 173-175.
- Jobin, M.P., Garmyn, D., Divies, C. and Guzzo, J.** (1999) Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology* **145**, 1245-1251.
- Kelly, W.J., Huang, C.M. and Asmundson, R.V.** (1993) Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microb.* **59**, 3969-3972.
- Khan, S.A.** (2005) Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* **53**, 126-136.
- Kiewiet, R., Kok, J., Seegers, J.F., Venema, G. and Bron, S.** (1993) The Mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microb.* **59**, 358-364.
- Kimura, M.** (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* **16**, 111 -120.
- Kitko, R.D., Cleeton, R.L., Armentrout, E.I., Lee, G.E., Noguchi, K., Berkmen, M.B., Jones, B.D. and Slonczewski, J.L.** (2009) Cytoplasmic acidification and the benzoate transcriptome in *Bacillus subtilis*. *PLoS One* **4**, e8255.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins,**



- R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 29-58.
- Krejčík, Z., Denger, K., Weinitschke, S., Hollemeyer, K., Pačes, V., Cook, A. and Smits, T. (2008) Sulfoacetate released during the assimilation of taurine-nitrogen by *Neptuniibacter caesariensis* purification of sulfoacetaldehyde dehydrogenase. *Arch Microbiol.* **190**, 159-168.
- Kunkee, R.E., Ough, C.S. and Amerine, M.A. (1964) Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. *Am J Enol Vitic.* **15**, 178-183.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Lonvaud-Funel, A. and Ribéreau-Gayon, P. (1983a) Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *Leuconostoc oenos* après réactivation. *Connaissance Vigne Vin* **17**, 55-71.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. and Ribereau-Gayon, P. (1983b) Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl Environ Microb.* **46**, 874-880.
- Larisika, M., Claus, H. and Konig, H. (2008) Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int J Food Microbiol.* **123**, 171-176.
- Le Jeune, C. and Lonvaud-Funel, A. (1997) Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): application to strain differentiation. *Res Microbiol.* **148**, 79-86.
- Lechiancole, T., Blaiotta, G., Messina, D., Fusco, V., Villani, F. and Salzano, G. (2006) Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst Appl Microbiol.* **29**, 375-381.
- Lederberg, J. and Tatum, E.L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature.* **158**, 558.
- Lerm, E., Engelbrecht, L. and 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.
- Li, Y., Canchaya, C., Fang, F., Raftis, E., Ryan, K.A., van Pijkeren, J.P., van Sinderen, D. and O'Toole, P.W. (2007) Distribution of megaplasmids in *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. *J Bacteriol.* **189**, 6128-6139.
- Linares, D.M., Kok, J. and Poolman, B. (2010) Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (Revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *J Bacteriol.* **192**, 5806-5812.
- Liu, M., Nauta, A., Francke, C. and Siezen, R.J. (2008) Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microb.* **74**, 4590-4600.
- Liu, S.Q. (2002) Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J Appl Microbiol.* **92**, 589-601.



- Livingston, D.M.** (1977) Inheritance of the 2  $\mu$ m DNA plasmid from *Saccharomyces*. *Genetics*. **86**, 73-84.
- Lonvaud-Funel, A.** (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol Lett.* **126**, 209-214.
- Lonvaud-Funel, A.** (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A.** (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 9-13.
- Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A.** (1988) Etude d'une altération des vins. "La maladie des vins filants". *Sc. Alim.* **8**, 33-49.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. and Desens, C.** (1988) Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J Sci Food Agric.* **44**, 183-191.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. and Ledoux, O.** (1991) Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J Appl Microbiol.* **71**, 501-508.
- Lonvaud-Funel, A., Renouf, V. and Strehaiano, P.** (2010) Microbiologie du vin. Bases fondamentales et applications. Ed Tec et Doc/Lavoisier, Paris.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. and Ruiz -Larrea, F.** (2007) Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentation. *Eur Food Res Tech.* **226**, 215 -223.
- Lucas, P.M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2008) High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl Environ Microb.* **74**, 811-817.
- Lucas, P.M., Wolken, W.A., Claisse, O., Lolkema, J.S. and Lonvaud-Funel, A.** (2005) Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl Environ Microb.* **71**, 1417-1424.
- Maicas, S.** (2001) The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol.* **56**, 35-39.
- Maicas, S., Gonzalez-Cabo, P., Ferrer, S. and Pardo, I.** (1999) Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. *Biotechnol Lett.* **21**, 349-353.
- Maicas, S., Pardo, I. and Ferrer, S.** (2000) The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *Int J Food Sci Tech.* **35**, 75-79.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang,**



- K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 15611-15616.
- Makarova, K.S. and Koonin, E.V. (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* **189**, 1199-1208.
- Malherbe, S., Tredoux, A.G., Nieuwoudt, H.H. and du Toit M. (2012) Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *Oenococcus oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **39**, 477-494.
- Mampel, J., Maier, E., Tralau, T., Ruff, J., Benz, R. and Cook, A.M. (2004) A novel outer-membrane anion channel (porin) as part of a putatively two-component transport system for 4-toluenesulphonate in *Comamonas testosteroni* T-2. *Biochem J.* **383**, 91-99.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M.V. and Muñoz, R. (2006) Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl Environ Microb.* **72**, 7954-7958.
- Marcobal, A.M., Sela, D.A., Wolf, Y.I., Makarova, K.S. and Mills, D.A. (2008) Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *J Bacteriol.* **190**, 564-570.
- Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genom Hum G.* **9**, 387-402.
- Martineau, B. and Henick-Kling, T. (1995) Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J Appl Microbiol.* **78**, 526-536.
- Martinez-Murcia, A.J. and Collins, M.D. (1990) A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* **58**, 73-83.
- Martinez-Murcia, A.J., Harland, N.M. and Collins, M.D. (1993) Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. *J Appl Bacteriol.* **74**, 532-541.
- Matthews, A., Grbin, P. and Jiranek, V. (2007) Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **77**, 329-337.
- Mesas, J.M., Rodriguez, M.C. and Alegre, M.T. (2001) Nucleotide sequence analysis of pRS2 and pRS3, two small cryptic plasmids from *Oenococcus oeni*. *Plasmid.* **46**, 149-151.
- Mesas, J.M., Rodríguez, M.C. and Alegre, M.T. (2011) Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett Appl Microbiol.* **52**, 258-269.
- Mesas, J.M., Rodriguez, M.C. and Alegre, M.T. (2004) Plasmid curing of *Oenococcus oeni*. *Plasmid.* **51**, 37-40.



- Meyer, F., Overbeek, R. and Rodriguez, A.** (2009) FIGfams: yet another set of protein families. *Nucleic Acids Res.* **37**, 6643-6654.
- Mills, D.A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D. and Makarova, K.** (2005) Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 465-475.
- Mills, S., McAuliffe, O.E., Coffey, A., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P.** (2006) Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev.* **30**, 243-273.
- Mira de Orduña, R., Liu, S., Patchett, M.L. and Pilone, G.J.** (2000) Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **183**, 31-35.
- Müller-Thurgau, H. and Osterwalder, A.** (1913) Die bakterien im wein and obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. *Zentr Bakt Parasitenk Hyg Abt.* **36**, 129-338.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A. and Lucas P.M.** (2008) Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett Appl Microbiol.* **47**, 594-599.
- Nielsen, J.C., Prah, C. and Lonvaud-Funel, A.** (1996) Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am J Enol Vitic.* **47**, 42-48.
- Nivoliez, A., Camares, O., Paquet-Gachinat, M., Bornes, S., Forestier, C. and Veisseire, P.** (2012) Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup>. *J. Biotechnol.* **160**, 236-241.
- Nyquist, O., McLeod, A., Brede, D., Snipen, L., Aakra, Å. and Nes, I.** (2011) Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* with emphasis on strains from meat. *Mol Genet Genomics.* **285**, 297-311.
- O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G., Ross, R.P. and Beresford, T.** (2009) Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* **9**, 50.
- Odat, O., Matta, S., Khalil, H., Kampranis, S.C., Pfau, R., Tsihli, P.N. and Makris, A.M.** (2007) Old Yellow Enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress and programmed cell death in yeast. *J Biol Chem.* **282**, 36010-36023.
- Olguín, N., Bordons, A. and Reguant, C.** (2010) Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *Int J Food Microbiol.* **15**, 88-95.
- Olguín, N., Bordons, A. and Reguant, C.** (2009) Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* **26**, 197-203.
- Orberg, P.K. and Sandine, W.E.** (1984) Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl Environ Microb.* **48**, 1129-1133.
- Pareek, C., Smoczynski, R. and Tretyn, A.** (2011) Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet.* **52**, 413-435.



- Parreira, R., São-José, C., Isidro, A., Domingues, S., Vieira, G. and Santos, M.A.** (1999) Gene organization in a central DNA fragment of *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 encoding lytic, integrative and non-essential functions. *Gene*. **226**, 83-93.
- Pasteur, L.** (1866) Etudes sur le vin.
- Pegg, D.E.** (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*. **20**, 5-14.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P., Martín, R. and Palop, M.** (2012) Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol*. **28**, 1423-1432.
- Peynaud, E. and Domercq, S.** (1961) Étude sur les bactériés lactiques du vin. *Ann. Technol. Agric.* **10**, 43-60.
- Peynaud, E. and Domercq, S.** (1968) Etude de quatre cents souches de conques hétérolactiques isolés de vins. *Ann Inst Pasteur* **19**, 159-169.
- Pittet, V., Abegunde, T., Marfleet, T., Haakensen, M., Morrow, K., Jayaprakash, T., Schroeder, K., Trost, B., Byrns, S., Bergsveinson, J., Kusalik, A. and Ziola, B.** (2012) Complete genome sequence of the beer spoilage organism *Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344T. *J Bacteriol*. **194**, 1271-1272.
- Poblet-Icart, M., Bordons, A. and Lonvaud-Funel, A.** (1998) Lysogeny of *Oenococcus oeni* (syn. *Leuconostoc oenos*) and study of their induced bacteriophages. *Curr Microbiol*. **36**, 365-369.
- Prevost, H., Cavin, J.F., Lamoureux, M. and Divies, C.** (1995) Plasmid and chromosome characterization of *Leuconostoc oenos* strains. *Am J Enol Vitic*. **46**, 43-48.
- Prunier, A.L. and Leclercq, R.** (2005) Role of *mutS* and *mutL* genes in hypermutability and recombination in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. **187**, 3455-3464.
- Rajewska, M., Wegrzyn, K. and Konieczny, I.** (2011) AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev*. **36**, 408-434.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. and Tobes, R.** (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol R*. **69**, 326-356.
- Reekmans, R., Smet, K.D., Chen, C., Hummelen, P.V. and Contreras, R.** (2005) Old yellow enzyme interferes with Bax-induced NADPH loss and lipid peroxidation in yeast. *FEMS Yeast Res*. **5**, 711-725.
- Reguant, C. and Bordons, A.** (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol*. **95**, 344-353.
- Renouf, V.** (2006) Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres - Relation avec la qualité du vin. Thèse. Université de Toulouse.
- Renouf, V., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol*. **75**, 149-164.



- Renouf, V., Delaherche, A., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2008) Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **35**, 27-33.
- Renouf, V. and Favier, M.** (2010) Genetic and physiological characterisation of *Oenococcus oeni* strains to perform malolactic fermentation in wines. *S Afr J Enol Vitic.* **31**, 75-81.
- Renouf, V. and Murat, M.** (2008) L'utilisation de levains malolactiques pour une meilleure maîtrise du risque Brettanomyces. *Revue des Oenologues* **126**, 11-15.
- Renouf, V., Vayssieres, L.C., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A.** (2009) Genetic and phenotypic evidence for two groups of *Oenococcus oeni* strains and their prevalence during winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**, 85-97.
- Ribéreau-Gayon, J.** (1936) Sur la "désacidification biologique" des vins. *S Sci Phys Nat Bordeaux*, 23-25.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A.** (1998) Traité d'œnologie. Tome I : Microbiologie du vin, vinification. Ed Dunod. Paris.
- Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Beneduce, L., Spano, G., Murat, M.L. and Lucas P** (2012) Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chem.* **135**, 1392-1396.
- Ruckert, C., Koch, D., Rey, D., Albersmeier, A., Mormann, S., Puhler, A. and Kalinowski, J.** (2005) Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum* fpr2-cysIXHDNYZ gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction. *BMC Genomics.* **6**, 121.
- Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. and Palop, M.L.** (2010) Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int J Food Microbiol.* **137**, 230-235.
- Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jimenez-Diaz, R.** (1991) Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentations. *J Appl Bacteriol.* **71**, 417-421.
- Russell, C. and Walker, T.K.** (1953) *Lactobacillus malefermentans* n.sp., isolated from beer. *J Gen Microbiol.* **8**, 160-162.
- Salema, M., Lolkema, J.S., San Romao, M.V. and Lourero Dias, M.C.** (1996) The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J Bacteriol.* **178**, 3127-3132.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K. and Yokotsuka, K.** (2001) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiol Lett.* **202**, 109-114.



- Schroeter, J. and Klaenhammer, T.** (2009) Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **292**, 1-6.
- Schumacher, M.A.** (2011) Bacterial plasmid partition machinery: a minimalist approach to survival. *Curr Opin Struc Biol.* **22**, 1-8.
- Sgorbati, B., Palenzona, D. and Ercoli, L.** (1987) Characterisation of the pesticides-resistance plasmid pBL34 from *Leuconostoc oenos*. *Microbiol Alim Nutr.* **5**, 295-301.
- Sgorbati, B., Palenzona, D. and Sozzi, T.** (1985) Plasmidograms in some heterolactic bacteria from alcoholic beverages and their structural relatedness. *Microbiol Alim Nutr.* **3**, 21-34.
- Siezen, R.J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M.** (2005) Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl Environ Microb.* **71**, 8371-8382.
- Siezen, R.J., Starrenburg, M.J.C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D. and van Hylckama Vlieg, J.E.T.** (2008) Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl Environ Microb.* **74**, 424-436.
- Silla Santos, M.H.** (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol.* **29**, 213-231.
- Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M.** (1993) Rolling circle-replicating plasmids from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol Microbiol.* **8**, 789-796.
- Solieri, L., Genova, F., Paola, M.D. and Giudici, P.** (2010) Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J Appl Microbiol.* **108**, 285-298.
- Stephan, C., Wesseling, S., Schink, T. and Jung, K.** (2003) Comparaison of eight computer programs for receiver-operating characteristic analysis. *Clin Chem* **49**, 433-439.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. and Calderón, F.** (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* **102**, 10-21.
- Tan-a-ram, P., Cardoso, T., Daveran-Mingot, M.-L., Kanchanatawee, S., Loubière, P., Girbal, L. and Coccagn-Bousquet, M.** (2011) Assessment of the diversity of dairy *Lactococcus lactis* subsp. lactis isolates by an integrated approach combining phenotypic, genomic, and transcriptomic analyses. *Appl Environ Microb.* **77**, 739-748.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V. and Lipman, D.J.** (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637.
- Teixeira, P., Castro, H. and Kirby, R.** (1996) Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett Appl Microbiol.* **22**, 34-38.



- Tenreiro, R., Santos, M.A., Paveia, H. and Vieira, G.** (1994) Inter-strain relationships among wine leuconostocs and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *J Appl Bacteriol.* **77**, 271-280.
- Teresa Alegre, M., Carmen Rodríguez, M. and Mesas, J.M.** (2009) Characterization of pRS5: A theta-type plasmid found in a strain of *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine that can be used to generate cloning vectors for lactic acid bacteria. *Plasmid.* **61**, 130-134.
- Torriani, S., Felis, G. and Fracchetti, F.** (2010) Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Ann Microbiol.* **11**, 1-7.
- Trotter, E.W., Collinson, E.J., Dawes, I.W. and Grant, C.M.** (2006) Old yellow enzymes protect against acrolein toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb.* **72**, 4885-4892.
- Ugliano, M., Genovese, A. and Moio, L.** (2003) Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem.* **51**, 5073-5078.
- Ugliano, M. and Moio, L.** (2005) Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem.* **53**, 10134-10139.
- Versari, A., Parpinello, G.P. and Cattaneo, M.** (1999) *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biot.* **23**, 447-455.
- Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L. and Ventura, S.** (1996) Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res Microbiol.* **147**, 651-660.
- Walling, E., Gindreau, E. and Lonvaud-Funel, A.** (2005) A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int J Food Microbiol.* **98**, 53-62.
- Wang, T.T. and Lee, B.H.** (1997) Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit Rev Biotechnol.* **17**, 227-272.
- Weidmann, S., Rieu, A., Rega, M., Coucheney, F. and Guzzo, J.** (2010) Distinct amino acids of the *Oenococcus oeni* small heat shock protein Lo18 are essential for damaged protein protection and membrane stabilization. *FEMS Microbiol Lett.* **309**, 8-15.
- Weinitschke, S., Denger, K., Cook, A.M. and Smits, T.H.M.** (2007) The DUF81 protein TauE in *Cupriavidus necator* H16, a sulfite exporter in the metabolism of C2 sulfonates. *Microbiology* **153**, 3055-3060.
- Williams, R.E. and Bruce, N.C.** (2002) 'New uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**, 1607-1614.
- Williams, R.E., Rathbone, D.A., Scrutton, N.S. and Bruce, N.C.** (2004) Biotransformation of explosives by the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins. *Appl Environ Microb.* **70**, 3566-3574.



- Yamaguchi, Y., Jung-Ho, P. and Masayori, I.** (2011) Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Ann Rev Gen.* **45**, 61-79.
- Yang, D. and Woese, C.R.** (1989) Phylogenetic structure of the leuconostocs: an interesting case of a rapidly evolving organism. *Syst Appl Microbiol.* **12**, 145-149.
- Yin, B., Yang, X., Wei, G., Ma, Y. and Wei, D.** (2008) Expression of two Old Yellow Enzyme homologues from *Gluconobacter oxydans* and identification of their citral hydrogenation abilities. *Mol Biotechnol.* **38**, 241-245.
- Zapparoli, G., Moser, M., Dellaglio, F., Tourdot-Maréchal, R. and Guzzo, J.** (2004) Typical metabolic traits of two *Oenococcus oeni* strains isolated from Valpolicella wines. *Lett Appl Microbiol.* **39**, 48-54.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S. and Dellaglio, F.** (2000) Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr Microbiol.* **40**, 351-355.
- Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. and Dellaglio, F.** (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett Appl Microbiol.* **27**, 243-246.
- Zavaleta, A.I., Martinez-Murcia, A.J. and Rodriguez-Valera, F.** (1996) 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology* **142**, 2105-2114.
- Zavaleta, A.I., Martinez-Murcia, A.J. and Rodriguez-Valera, F.** (1997) Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microb.* **63**, 1261-1267.
- Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Chen, X., Bao, Q., Meng, H., Hu, S. and Zhang, H.** (2008) Complete nucleotide sequence of plasmid plca36 isolated from *Lactobacillus casei* Zhang. *Plasmid.* **60**, 131-135.
- Zhao, W., Chen, Y., Sun, Z., Wang, J., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Chen, W. and Zhang, H.** (2011) Complete Genome Sequence of *Lactobacillus helveticus* H10. *J Bacteriol.* **193**, 2666-2667.
- Zhao, G. and Zhang, G.** (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol.* **99**, 333-338.
- Zhao, G. and Zhang, G.** (2009a) Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Int J Food Microbiol.* **135**, 64-67.
- Zhao, G. and Zhang, G.** (2009b) Influences of protectants, rehydration media and storage on the viability of freeze-dried *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* **25**, 1801-1806.
- Zhou, M., Theunissen, D., Wels, M. and Siezen, R.** (2010) LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of Lactic Acid Bacteria. *BMC Genomics.* **11**, 651.



**Zhu, Y., Zhang, Y. and Li, Y.** (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**, 597-610.

**Zuniga, M., Pardo, I. and Ferrer, S.** (1996) Nucleotide sequence of plasmid p4028, a cryptic plasmid from *Leuconostoc oenos*. *Plasmid* **36**, 67-74.



# **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**



## Publications dans des journaux à comité de lecture

**Favier, M., Bihère, E., Lonvaud-Funel, A., Moine, V., Lucas, P.M.** Identification of pOENI-1 and related plasmids in *Oenococcus oeni* strains performing the malolactic fermentation in wine. *PLoS One* **7**, e49082.

**Renouf, V. and Favier, M.** (2010) Genetic and physiological characterisation of *Oenococcus oeni* strains to perform malolactic fermentation in wines. *S Afr J Enol Vitic* **31**, 75-81.

## Publications de vulgarisation

**Favier, M., Lucas, P.M., Moine, V., Renouf, V.** (2011) Les nouvelles connaissances sur la génétique d'*Oenococcus oeni*. *Revue des Œnologues* **141**, 28 : 31.

## Communications orales dans des congrès nationaux et internationaux

**Favier, M., Bihère, E., Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Moine, V., Lucas, P.M.** Plasmid and wine adaptation of *Oenococcus oeni* strains. 9<sup>ième</sup> Symposium International d'Œnologie de Bordeaux, Bordeaux, France, Juin 2011.

**Favier, M., Bihère, E., Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Moine, V., Lucas, P.M.** Plasmid contributing to wine adaptation and technological properties of *Oenococcus oeni* strains. 62<sup>nd</sup> American Society for Enology and Viticulture National Conference, Monterey, Californie, Juin 2011.

## Communications affichées

**Favier, M., Bihère, E., Lonvaud-Funel, A., Coulon, J., Moine, V., Lucas, P.M.** Identification de plasmides impliqués dans l'adaptation d'*Oenococcus oeni* au vin. 18<sup>ième</sup> colloque du Club des Bactéries Lactiques, Clermont-Ferrand, France, Mai 2012.

**Favier, M.** Recherche des caractéristiques génétiques à l'origine des phénotypes d'intérêt technologique chez la bactérie du vin *Oenococcus oeni* : Etude comparative des plasmides et génomes complets. Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Arcachon, France, Avril 2012. *Prix de la meilleure communication affichée.*

**Favier, M., Bihère, E., Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Moine, V., Lucas, P.M.** Plasmid and wine adaptation of *Oenococcus oeni* strains. 9<sup>ième</sup> Symposium International d'Œnologie de Bordeaux, Bordeaux, France, Juin 2011.



**Favier, M., Renouf, V., El Khoury, M., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P.M.** Utilisation combinée d'approches génétiques et phénotypiques pour la sélection de souches d'*Oenococcus oeni* d'intérêt œnologique. 17<sup>ième</sup> colloque du Club des Bactéries Lactiques, Nancy, France, Octobre 2010.

**Favier, M., Bilhère, E., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P.M.** Distribution of plasmids in the *Oenococcus oeni* species and correlation with the technological properties of strains. 14<sup>th</sup> Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia, 2010.

