



Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
UMR PAM, Equipe VALMiS
Ecole doctorale ES – Environnements – Santé

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences des Aliments
Spécialité : Microbiologie

Présentée par

Magali MAITRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Le chaperon moléculaire Lo18 de *Oenococcus oeni* : Caractérisation de ses activités en lien avec sa plasticité oligomérique

**Soutenue publiquement le 19 Décembre 2012 devant la commission d'examen
suivante :**

**Carmen GARRIDO
Alexandra GRUSS
Anne-Marie REVOL-JUNELLES
Alain DOLLA
Jean GUZZO
Jacques COVES
Stéphanie WEIDMANN**

INSERM, Dijon
INRA, Jouy-en-Josas
ENSAIA, Nancy
CNRS, Marseille
Université de Bourgogne, Dijon
CNRS, Grenoble
Université de Bourgogne, Dijon

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur
Co-Directeur
Co-Encadrante

Remerciements

J'adresse mes remerciements à l'Université de Bourgogne et au Conseil Régional de Bourgogne pour leur soutien financier essentiel au bon déroulement de ce travail de thèse.

Dès les premières lignes de ce manuscrit, je tiens également à remercier l'ensemble des membres du jury pour leur contribution : Carmen GARRIDO pour avoir endossé le rôle de présidente du jury, Alexandra GRUSS et Anne-Marie REVOL-JUNELLES pour avoir accepté la charge de rapporteur ainsi qu'Alain DOLLA qui me fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Jean GUZZO, mon directeur de thèse, pour ces nombreux conseils et son appui scientifique.

Merci à Jacques COVES, mon co-directeur, pour son accueil au cours de mes différents séjours à l'IBS de Grenoble et pour sa rigueur scientifique toujours très bénéfique.

Je remercie également Stéphanie WEIDMANN qui a co-encadré ce travail, en particulier, pour tous ces encouragements au cours de ces trois ans et ses réponses patientes à toutes mes questions.

Merci à Hervé ALEXANDRE de m'avoir accueillie au sein de l'équipe VALMiS (anciennement ReVV) mais également pour sa participation aux comités de thèse.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et qui m'ont permis de mener à bien ce projet :

- Vanessa DAVID qui a toujours été là, avec le sourire, pour les questions pratiques et logistiques,
- Florence MARTIN qui a été une voisine de palliasse très agréable mais qui est partie trop vite,
- Elena STEFANELLI, Giovanna FELIS, Fabio FRACHETTI, Antonio CASALE, Noël DOUGBA DAGO et Sandra TORIANI qui m'ont fait découvrir Vérone et ses environs, pour leur joie de vivre et leur investissement dans ce travail,
- Florence DUBOIS-BRISSONNET qui m'a accueillie à Massy pour sa disponibilité, sa gentillesse et pour avoir partagé avec moi son savoir-faire sur l'extraction et l'analyse des acides gras membranaires,
- Christine EBEL et Aline APPOURCHAUD pour m'avoir formée sur la technique d'ultracentrifugation analytique ainsi que Guy SCHOEHN et Daphna FENEL pour leur aide en microscopie électronique,
- Isabelle PETIT-HAERTLEIN pour ses conseils et ses astuces en Biochimie des protéines.

Un grand merci aux doctorants et post-docs, en particulier Virginie, Momo, Charlie, Chloé, Florian, Maryse, Cédric, Maud, Alexandre, Mario et Joan, qui m'ont accompagnés pendant ces trois ans. Merci également à Aurélie de CESEO pour son amitié et son soutien.

Une petite pensée également pour tous mes amis doctorants des autres laboratoires de Dijon, Mélanie, Carole, Michaël, Jessica, Manu, Déborah et Elodie. Merci pour toutes ces pauses déjeuner animées. Bon courage à vous.

L'aboutissement de ce travail n'aurait pas pu être possible sans le soutien de :

- Mes parents qui m'ont toujours fait confiance et encouragée tout au long de mes études,
- Alexandra, ma sœur, avec qui j'ai pu partager mes aventures au labo et qui me comprends lorsque je lui parle de Microbio,
- Rémi qui m'a si souvent épaulée lors des moments de doute et merci surtout pour sa patience quotidienne.

Merci à tous !!

Liste des abréviations

ADP : adénosine-5'-diphosphate

ATP : adénosine-5'-triphosphate

BA : benzyl alcohol, alcool benzylique

CFA : cyclic fatty acid, acide gras cyclique

Clp : caseinolytic protein

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CS : citrate synthase

CtsR : class three stress gene repressor, répresseur des genes de réponse au stress de classe III

DMPC : dimyristoylphosphocholine

DOPE : dioléylphosphatidyléthanolamine

DPH : sonde fluorescente 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène

DOPG : dioléylphosphatidylglycérol

DPPC : dipalmitoylphosphocholine

DPPE : dipalmitoylphosphatidyléthanolamine

DPPG : dipalmitoylphosphatidylglycérol

Fab : fatty acid biosynthesis, biosynthèse des acides gras

FAME : fatty acid methyl ester, ester méthylé d'acide gras

FML : fermentation malolactique

FRET : fluorescence resonance energy transfert, transfert d'énergie de fluorescence de type Förster

HS-AFM : high speed-atomic force microscopy, microscopie à force atomique haute vitesse

Hsp : heat shock protein, protéine de réponse au stress

LDH : lactate déshydrogénase

MGlcDG : monoglucosyldiacylglycérol

NBD : nucleotide binding domaine

pHint : pH intracellulaire

RT-qPCR : PCR quantitative suite à une transcription inverse

SFA : saturated fatty acid, acide gras saturé

sHsp : small heat shock protein, protéine de réponse au stress de faible masse moléculaire

TMA-DPH : sonde fluorescente 1-[4-(triméthyl-amino)phényl]-6-diphényl-1,3,5-hexatriène

UFA : unsturated ffty acid, acide gras insaturé

Liste des travaux

Articles

Maitre M, Weidmann S, Dubois-Brissonnet F, David V, Covès J, Guzzo J. “A chronological model of the adaptation of *Oenococcus oeni* to ethanol stress involving both the small heat shock protein Lo18 and changes in membrane fatty acid composition”. *Soumis à Journal of Biological Chemistry*.

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Fenel D, Schoehn G, Ebel C, Covès J, Guzzo J. **2012**. “The oligomer plasticity of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection”. *Biochemical Journal*, 444 : 97-104.

Communications orales

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Fenel D, Schoehn G, Ebel C, Covès J, Guzzo J. **2012**. “Relation entre l’oligomérisation de la protéine de stress Lo18 de la bactérie *Oenococcus oeni* et son activité de stabilisation de substrats protéiques et lipidiques”. Workshop de Microbiologie, Dijon.

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Fenel D, Schoehn G, Ebel C, Covès J, Guzzo J. **2012**. “Relation étroite entre la structure et les fonctions de la protéine de stress Lo18 de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*”. 18^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, Clermont Ferrand.

Communications affichées

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Covès J, Guzzo J. **2011**. “Characterization of structural and functional properties of the small HSP Lo18 from *Oenococcus oeni*”. 10th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Netherlands.

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Ebel C, Covès J, Guzzo J. **2011**. “La smHsp Lo18 de *Oenococcus oeni* est capable de protéger les protéines dénaturées et de stabiliser les membranes de manière pH-dépendante”. XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon.

Maitre M, Rieu A, Ebel C, Covès J, Weidmann S, Guzzo J. **2011**. “Impact of pH on the oligomerisation and the functions of Lo18, a small heat shock protein of *Oenococcus oeni*”. 4th Congress of European Microbiologists FEMS, Geneva, Switzerland.

Maitre M, Ronez F, Weidmann S, Covès J, Guzzo J. **2010**. “Caractérisation de l’activité chaperon moléculaire de différentes formes mutées de Lo18, une protéine de stress de faible masse moléculaire de *Oenococcus oeni*”. XVI^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon.

Maitre M, Martin F, Allonneau C, Weidmann S, Guzzo J. **2010**. “Effet d’un agent fluidifiant de la membrane sur la physiologie et l’expression de gènes de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*”. 8^{ème} Congrès National de la SFM, Marseille.

Ronez F, **Maitre M**, Weidmann S, Rieu A, Covès J, Guzzo J. **2010**. “La protéine de stress Lo18 de *Oenococcus oeni* : génération de protéines mutantes et caractérisation fonctionnelle *in vitro* sur substrats lipidiques et protéiques”. 8^{ème} Congrès National de la SFM, Marseille.

Sommaire

AVANT-PROPOS	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. <i>Oenococcus oeni</i> et le milieu vin	7
I.1. La fabrication du vin	7
I.2. <i>Oenococcus oeni</i> et la fermentation malolactique	8
I.2.1 La fermentation malolactique	9
I.2.2 L'espèce <i>Oenococcus oeni</i>	10
I.2.3 Les impacts de la fermentation malolactique sur les vins	13
I.3. La réponse au stress chez <i>O. oeni</i>	14
I.3.1 L'activation des H ⁺ -ATPases et de la FML	15
I.3.2 Les mécanismes de maintien de l'intégrité membranaire	16
I.3.3 La synthèse de protéines de réponse au stress	16
I.3.3.a Les chaperons moléculaires universels	17
I.3.3.b Les protéines Clp	20
I.3.3.c Les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire chez <i>O. oeni</i>	22
II. Les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire (sHsp)	24
II.1. Généralités sur les sHsp	24
II.1.1 Les sHsp : des protéines ubiquitaires	24
II.1.2 Les caractéristiques des sHsp	24
II.1.3 Les localisations cellulaires des sHsp	25
II.2. La séquence protéique des sHsp	26
II.2.1 La région N-terminale	27
II.2.2 Le domaine α -cristallin	27
II.2.3 L'extension C-terminale	28
II.3 L'oligomérisation des sHsp	29
II.3.1 La diversité des structures oligomériques des sHsp	29
II.3.2 L'oligomérisation des sHsp : un processus dynamique	30
II.3.3 L'influence des conditions physico-chimiques sur l'oligomérisation des sHsp	30
II.4. Les fonctions cellulaires des sHsp	32
II.4.1 L'activité chaperon : la prise en charge des substrats protéiques par les sHsp	32
II.4.2 L'activité lipochaperon : l'interaction des sHsp avec des substrats lipidiques	34
II.5. Cas particulier d'une sHsp : la protéine Lo18 de <i>O. oeni</i> et la régulation de sa synthèse	35
II.6. Les sHsp et les maladies humaines, leurs applications en biotechnologie	38
III. Le maintien de l'intégrité membranaire	41
III.1. Les constituants des membranes bactériennes	41
III.1.1 Les différentes classes de phospholipides	42
III.1.2 Les acides gras bactériens	44
III.1.3 Les protéines membranaires	46
III.2. La fluidité membranaire	47
III.2.1 Définition	47
III.2.2 Les techniques de mesure de la fluidité membranaire	47
III.2.3 L'impact des conditions environnementales sur la fluidité des membranes	48
III.2.3.a Les variations de température	49
III.2.3.b La présence d'éthanol	49
III.2.3.c L'ajout d'alcool benzylique	49
III.2.3.d La présence d'ions divalents	50
III.2.3.e Les modifications de pH	50
III.3. La régulation de la fluidité membranaire par les bactéries	50
III.3.1 Les modifications de la composition en lipides membranaires	50

III.3.1.a	La synthèse d'acides gras chez les bactéries.....	51
III.3.1.b	Les changements de longueur des chaînes d'acides gras	53
III.3.1.c	L'insaturation des acides gras.....	53
III.3.1.d	La transformation des acides gras <i>cis</i> en acides gras <i>trans</i>	54
III.3.1.e	La cyclopropanation des acides gras insaturés.....	54
III.3.1.f	La modification des têtes polaires des phospholipides.....	55
III.3.2	L'influence des protéines de stress sur la fluidité membranaire	55
III.3.2.a	Les chaperons moléculaires universels (Hsp)	55
III.3.2.b	Les protéines de stress de faible masse moléculaire (sHsp)	56
OBJECTIFS DE LA THESE		61
MATERIELS ET METHODES		65
I.	Matériel biologique	67
I.1.	<i>Oenococcus oeni</i>	67
I.2.	<i>Escherichia coli</i>	67
I.3.	Conditions de stress	68
II.	Purification de la protéine Lo18 et des protéines modifiées	68
III.	Détermination du degré d'oligomérisation	70
III.1.	Chromatographie d'exclusion moléculaire	70
III.2.	Ultracentrifugation analytique	71
III.3.	Microscopie électronique	72
IV.	Détermination de l'activité chaperon moléculaire	73
IV.1.	Préparation de la citrate synthase	73
IV.2.	Mesure de l'agrégation thermique de la citrate synthase.....	73
V.	Détermination de l'activité de régulation de la fluidité membranaire	73
V.1.	Extraction des lipides membranaires de <i>Oenococcus oeni</i> et fabrication de liposomes natifs.....	73
V.2.	Fabrication de liposomes synthétiques	74
V.3.	Mesures d'anisotropie de fluorescence	75
V.4.	Détermination de la composition en acides gras membranaires	76
VI.	Immunoblotting et cross-linking au BS³	77
VII.	Mesure de viabilité cellulaire	78
VIII.	Mesure de l'activité H⁺-ATPasique membranaire	78
IX.	Etude transcriptomique : Préparation d'ARNm en vue d'une hybridation sur biopuces CombiMatrix	79
IX. 1.	Extraction des ARN totaux et traitement à la DNase	79
IX.2.	Enrichissement des échantillons en ARNm	80
X.	PCR quantitative	81
X.1.	Extraction d'ADN.....	81
X.2.	Extraction d'ARN et traitement à la DNase	82
X.3.	Reverse transcription et PCR en temps réel	83
X.3.1	Choix des amorces	83
X.3.2	PCR en temps réel.....	85
RESULTATS		87
I.	Caractérisation de la relation structures - fonctions de la protéine Lo18	89
I.1.	Introduction.....	89
I.2.	Article I	90
I.3.	Résultats complémentaires	101
II.	Caractérisation de l'interaction Lo18 – membrane plasmique	105
II.1.	Introduction.....	105

II.2.	Article II	106
II.3.	Résultats complémentaires	120
III.	Etude du transcriptome de la bactérie <i>O. oeni</i> suite à une fluidification membranaire	125
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		139
1.	Réponse de <i>O. oeni</i> à des stress fluidifiant sa membrane cytoplasmique	141
2.	Interaction de Lo18 avec la membrane plasmique de <i>O. oeni</i>	144
3.	Activité chaperon et assemblage multimérique de Lo18	147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		151

Liste des figures

Figure 1 : Principes de fabrication des vins blancs et rouges	7
Figure 2 : Dégradation du glucose durant la fermentation alcoolique	8
Figure 3 : Voies de transformation du malate chez les bactéries	9
Figure 4 : Mécanisme de transport du malate et du lactate chez <i>O. oeni</i>	9
Figure 5 : Arbre phylogénétique des <i>Lactobacillales</i> construit suite à l'alignement des séquences concaténées des protéines ribosomales	10
Figure 6 : Arbre phylogénétique classant 43 souches de <i>O. oeni</i> suivant leur profil de restriction obtenu par électrophorèse en champ pulsé suite à la digestion de leur ADN génomique par l'enzyme NotI	11
Figure 7 : Images de <i>Oenococcus oeni</i> ATCC BAA-1163 obtenues en microscopie électronique à balayage	12
Figure 8 : Les changements biochimiques intervenant lors de la FML et les modifications métaboliques chez <i>O. oeni</i>	14
Figure 9 : Les mécanismes de réponse au stress chez <i>O. oeni</i>	15
Figure 10 : Modèle présentant le cycle de repliement d'un peptide par le système chaperon GroEL/GroES	18
Figure 11 : Structure du complexe GroEL-GroES de <i>E. coli</i>	19
Figure 12 : Schéma représentant le cycle de repliement d'un peptide par le système chaperon DnaK/DnaJ/GrpE	19
Figure 13 : Modèle de désagrégation protéique par ClpB	20
Figure 14 : Structure de ClpP de <i>E. coli</i> obtenue aux rayons X	21
Figure 15 : Mécanismes d'action des protéines Clp	22
Figure 16 : Alignement de séquences protéiques de sHsp humaines, eucaryotes et procaryotes	26
Figure 17 : Structures cristallines des sHsp Hsp16.5 de <i>Methanococcus jannaschii</i> et de Hsp16.9 du blé	29
Figure 18 : Mécanisme d'oligomérisation et activité chaperon des sHsp	32
Figure 19 : Immunolocalisation de Lo18 chez <i>O. oeni</i> utilisant des anticorps dirigés contre Lo18 et des anticorps secondaires couplés à des particules d'or	35
Figure 20 : Organisation de la région promotrice du gène <i>hsp18</i>	37
Figure 21 : Structure de l'opéron <i>clpC</i> chez <i>B. subtilis</i>	38
Figure 22 : Modèle de la régulation de l'expression des gènes de stress <i>via</i> le répresseur CtsR chez <i>B. subtilis</i>	38
Figure 23 : La structure de la membrane cytoplasmique des procaryotes	41
Figure 24 : Déplacements des lipides dans une bicouche lipidique	43
Figure 25 : Structures formées par les molécules amphiphiles en milieu aqueux	43
Figure 26 : Organisation des molécules amphiphiles dans une phase lipide-eau	44
Figure 27 : Les différentes conformations des chaînes d'acides gras	45
Figure 28 : Schéma représentatif de la technique d'anisotropie de fluorescence	48
Figure 29 : Initiation de la synthèse et cycle d'élongation des acides gras	51
Figure 30 : Comparaison de la voie de biosynthèse des acides gras saturés et insaturés chez <i>E. coli</i> et <i>S. pneumoniae</i>	52
Figure 31 : Organisation du cluster <i>fab</i> chez <i>S. pneumoniae</i>	53
Figure 32 : Cyclopropanation d'un acide gras par l'enzyme CFA synthase	54
Figure 33 : Modèle de régulation de la fluidité membranaire chez <i>Synechocystis</i> suite à un stress fluidifiant la membrane	58
Figure 34 : Séquence nucléotidique des sHsp Lo18 sauvage ou modifiées utilisées	68
Figure 35 : Schéma simplifié représentant le principe de la chromatographie d'interactions hydrophobes	69
Figure 36 : Chromatogramme type obtenu lors de la purification de la protéine Lo18 sauvage par chromatographie d'interactions hydrophobes	69
Figure 37 : Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie des différentes fractions cellulaires obtenues lors de la purification de la protéine Lo18 sauvage	70

Figure 38 : Schéma simplifié représentant le principe de la chromatographie d'exclusion moléculaire	70
Figure 39 : Schéma simplifié du principe d'ultracentrifugation analytique	71
Figure 40 : Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse	76
Figure 41 : Schéma représentant les étapes de l'immunoblotting permettant la révélation de Lo18.....	78
Figure 42 : Electrophorégramme obtenu par électrophorèse capillaire d'un échantillon d'ARN total	80
Figure 43 : Représentation schématisée de la méthode de capture des ARNr pour l'enrichissement des ARNm	80
Figure 44 : Electrophorégramme obtenu par électrophorèse capillaire d'un échantillon enrichi en ARNm	81
Figure 45 : Exemple de résultats obtenus par qPCR.....	85
Figure 46 : Alignement des séquences protéiques du domaine α -cristallin de la sHsp Lo18 de <i>O. oeni</i> et de HspH de <i>B. japonicum</i>	101
Figure 47 : Etude de la structure de la protéine Lo18 et des protéines modifiées	101
Figure 48 : Activité chaperon de la protéine Lo18 et des protéines modifiées.....	102
Figure 49 : Activité lipochaperon de la protéine Lo18 et des protéines modifiées.....	103
Figure 50 : Contenu en acides gras des liposomes.....	120
Figure 51 : Influence des conditions de croissance de <i>O. oeni</i> sur la fluidité de liposomes.....	121
Figure 52 : Evolution de la fluidité de liposomes synthétiques composés de DPPG, DPPE, DOPG ou DOPE	123
Figure 53 : Evolution de la viabilité cellulaire (%) de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163 en présence de différentes concentrations de BA.....	126
Figure 54 : Évolution de la fluidité membranaire (anisotropie) lors d'un stress BA 60 mM à 30°C sur des cellules de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163	127
Figure 55 : Contenu en acides gras des membranes de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163	129
Figure 56 : Immunoblotting montrant la synthèse de la protéine Lo18 en conditions de stress chez <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163	130
Figure 57 : Classement des gènes de <i>O. oeni</i> PSU-1 dont le taux de transcrits varie suite à un stress BA (60 mM) de 30 min suivant la fonction de leur produit (distribution COG).....	131
Figure 58 : Comparaison de l'organisation des clusters Fab chez <i>S. pneumoniae</i> D39 et <i>O. oeni</i> PSU-1	134
Figure 59 : Voies de biosynthèse de <i>O. oeni</i> PSU-1 activées suite à un stress BA de 30 min	136

Liste des tableaux

Tableau I : Les classes courantes de phospholipides.....	42
Tableau II : Structure chimique et désignations d'un acide gras saturé et de son acide gras mono-insaturé correspondant selon la nomenclature chimique et biochimique	45
Tableau III : Les acides gras bactériens usuels	46
Tableau IV : Caractéristiques des phospholipides commerciaux utilisés.....	74
Tableau V : Séquences des amorces utilisées	84
Tableau VI : Activité H ⁺ -ATPasique d'extraits membranaires de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163 après un stress BA 60 mM de 5 ou 30 minutes	128
Tableau VII : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans la réponse au stress pour des cellules de <i>O. oeni</i> PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes	132
Tableau VIII : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans le métabolisme des acides nucléiques et des protéines pour des cellules de <i>O. oeni</i> PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes	133
Tableau IX : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans le métabolisme cellulaire pour des cellules de <i>O. oeni</i> PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes	133
Tableau X : Niveau d'expression des gènes codant pour des protéines hypothétiques et des pseudogènes pour des cellules de <i>O. oeni</i> PSU-1 soumises à un stress BA de 30 min	135

AVANT-PROPOS

Oenococcus oeni est une bactérie à Gram positif responsable de la fermentation malolactique (FML) des vins (Alexandre *et al.*, 2004; Lonvaud-Funel, 1999). Cependant, le vin est un milieu hostile à la croissance des microorganismes car il présente de nombreux stress environnementaux comme par exemple la présence d'éthanol, un pH faible ou encore de nombreuses carences nutritionnelles (Lonvaud-Funel, 1999). Ces stress peuvent avoir des conséquences très défavorables sur la membrane cytoplasmique et les protéines cellulaires des microorganismes. Pour pouvoir se développer dans les milieux stressants, les bactéries doivent donc mettre en place des mécanismes leur permettant de contrecarrer les effets délétères des stress. Parmi ces mécanismes, la synthèse des protéines de réponse au stress, en particulier les protéines de stress de faible masse moléculaire (sHsp), occupe une place importante. Ainsi, elles ont été relativement bien décrites dans la littérature tant au niveau de leur structure que de leurs fonctions (Basha *et al.*, 2011; Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). D'une part, les sHsp sont considérées comme des éléments clés du réseau de contrôle de la qualité des protéines cellulaires. En effet, elles possèdent une activité de protection des protéines cytoplasmiques, nommée activité chaperon, qui leur permet de limiter l'agrégation protéique lors de stress (Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). D'autre part, certaines sHsp ont la capacité de s'associer avec les membranes cellulaires où elles peuvent alors exercer une seconde activité, appelée activité lipochaperon, qui leur permet de préserver l'intégrité membranaire en stabilisant la fluidité des membranes cellulaires (Horvath *et al.*, 2008; Nakamoto & Vigh, 2007).

L'étude de la réponse adaptative au stress de *O. oeni* constitue une des thématiques de recherche de l'équipe VALMiS. On distingue notamment la synthèse de la sHsp Lo18 qui a déjà fait l'objet de nombreuses études au laboratoire. Ces travaux indiquent que cette sHsp est produite en réponse à de nombreux stress rencontrés par *O. oeni* dans le vin (Guzzo *et al.*, 1994; Guzzo *et al.*, 1997; Guzzo *et al.*, 1998; Guzzo *et al.*, 2000) où elle présente alors diverses localisations cellulaires (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Jobin *et al.*, 1997). De plus, des activités de chaperon moléculaire et de lipochaperon ont été démontrées pour Lo18 aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Weidmann *et al.*, 2010). Malgré toutes ces études, de nombreuses zones d'ombre subsistent concernant le fonctionnement de Lo18. Ce travail de thèse a donc pour but dans un premier temps de caractériser la relation existant entre les structures et les fonctions de Lo18, d'étudier dans un deuxième temps l'association entre Lo18 et la membrane plasmique de *O. oeni* et pour finir d'identifier les mécanismes de réponse mis en place par *O. oeni* suite à une fluidification membranaire.

Ce manuscrit comprend un premier chapitre bibliographique qui décrit les connaissances acquises sur *O. oeni* et le milieu vin, les structures et les fonctions des sHsp puis les mécanismes permettant le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires. Suite à la présentation des matériels et des méthodes utilisés lors de ce travail, les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques et de résultats

complémentaires. Le premier chapitre est consacré à l'étude de la plasticité oligomérique de Lo18 en lien avec ses activités, aussi bien sur substrats lipidiques que protéiques. Le deuxième chapitre traite de la caractérisation de l'interaction entre Lo18 et des substrats lipidiques, plus particulièrement ceux de la membrane de *O. oeni*. Le troisième chapitre s'intéresse à l'impact d'une fluidification membranaire sur la physiologie et l'expression de gènes chez *O. oeni*. Ce manuscrit est ensuite clôturé par une synthèse critique des résultats et des propositions de perspectives permettant de compléter ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. *Oenococcus oeni* et le milieu vin

La fabrication du vin peut être résumée comme la biotransformation du moût (jus du raisin après pressurage) par *Saccharomyces cerevisiae* lors d'une première étape fermentaire appelée fermentation alcoolique. Ensuite, une seconde fermentation réalisée par la bactérie *Oenococcus oeni*, a parfois lieu : c'est la fermentation malolactique (FML). Dans cette partie, nous décrirons le processus général de fabrication des vins, puis nous nous focaliserons plus particulièrement sur le rôle de *O. oeni* et sa relation avec son milieu environnemental.

I.1. La fabrication du vin

On distingue trois grandes catégories de vins issus du raisin : les vins rouges, les vins blancs et les vins effervescents. Lors de leur fabrication, 3 étapes sont communes à toutes les vinifications : (i) l'éraflage qui permet l'élimination des rafles du reste de la vendange, (ii) le pressurage qui a pour but de séparer le marc contenant les pellicules et les pépins du jus appelé moût et (iii) la cuvaïson qui comprend la macération permettant l'extraction des composés du moût et la/les étape(s) de fermentation (Madigan & Martinko, 2007).

Pour l'obtention d'un vin blanc, l'étape de pressurage est réalisée avant la cuvaïson pour éviter sa coloration. En revanche, les vins rouges subissent une macération prolongée afin d'extraire les tanins et les matières colorantes comme les anthocyanes contenues dans la pellicule. Ces principales étapes sont représentées dans la Figure 1.

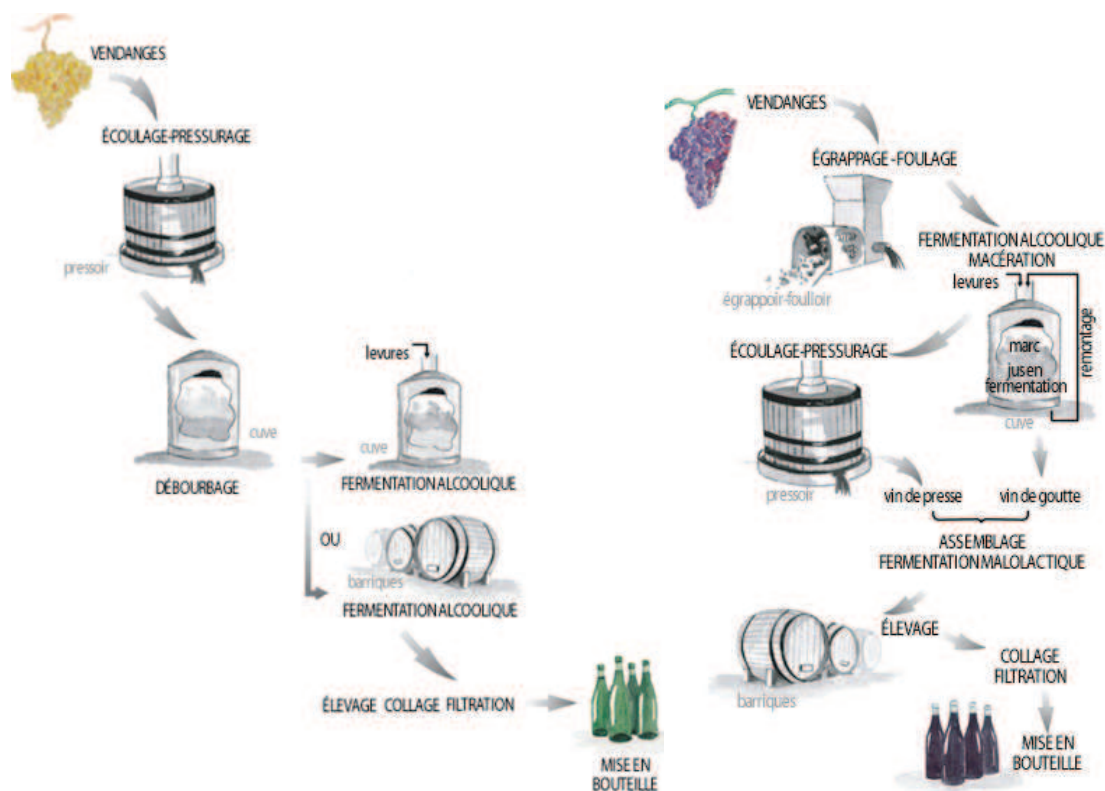


Figure 1 : Principes de fabrication des vins blancs et rouges (d'après <http://www.vins-vouvray.com/fabrication-vin.php>).

L'étape de fermentation alcoolique (FA) est réalisée, que ce soit pour les vins rouges ou blancs, principalement grâce à des levures du type *Saccharomyces cerevisiae*. Ces levures peuvent (i) être ensemencées directement dans le moût après pressurage par ajout de ferments commerciaux ou (ii) être issues naturellement des grappes de raisin (dans ce cas elles sont appelées levures indigènes). En effet, après récolte, les baies de raisin sont recouvertes de nombreux microorganismes comprenant des levures, des moisissures ou encore des bactéries comme les bactéries lactiques. Les levures, qui résistent aux fortes concentrations en sucre ($> 210 \text{ g.L}^{-1}$) et au pH très bas (3 - 3,5) du moût, sont capables de se développer rapidement afin de réaliser la FA (Lonvaud-Funel, 1999). Cette étape permet de transformer les sucres présents dans le moût en éthanol (Figure 2).

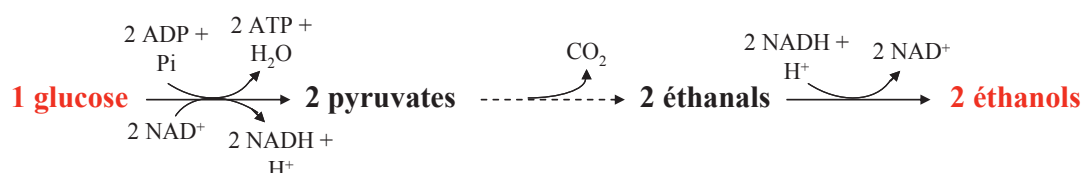


Figure 2 : Dégradation du glucose durant la fermentation alcoolique.

En fin de FA, les levures ont consommé la majorité des sources carbonées et azotées ce qui engendre l'apparition d'une importante mortalité. L'autolyse des levures libère des facteurs de croissance (comme par exemple des acides aminés, des polysaccharides ou encore des mannoprotéines) qui stimulent la croissance des bactéries lactiques initialement présentes sur les baies de raisin, les feuilles de vigne et le matériel vinaire (Alexandre *et al.*, 2004; Guilloux-Benatier *et al.*, 1985). Ces bactéries appartiennent aux genres *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. L'augmentation progressive du taux d'éthanol au cours de la FA et la libération de produits issus du métabolisme notamment lipidique des levures (comme l'acide dodécanoïque ou acide décanoïque), qui sont de puissants inhibiteurs de croissance des bactéries lactiques, ont tendance à sélectionner naturellement l'espèce *Oenococcus oeni* qui devient alors majoritaire en fin de FA. Cependant, les genres *Pediococcus* et *Lactobacillus* peuvent également survivre dans ces conditions difficiles (ils représentent de potentiels agents d'altération une fois le processus de fabrication du vin terminé) (Lonvaud-Funel, 1999). *O. oeni* est une bactérie essentielle à l'élaboration des vins car elle réalise une seconde fermentation, étape parfois facultative dans l'élaboration des vins, appelée fermentation malolactique (FML).

1.2. *Oenococcus oeni* et la fermentation malolactique

De nos jours, la FML est recherchée dans la plupart des vins blancs et des vins rouges du monde mais il n'en a pas toujours été ainsi. En effet, jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, les bactéries lactiques étaient considérées comme des « microbes nuisibles ». Pasteur écrivit même « les levures font le vin, les bactéries le détruisent ». La FML était alors considérée comme une maladie du vin. Cependant depuis

les années 1930, une prise de conscience de son impact positif sur la qualité des vins a eu lieu (Alexandre *et al.*, 2008).

I.2.1 La fermentation malolactique

La fermentation malolactique est une réaction biologique qui consiste à transformer le L-malate en L-lactate par décarboxylation en utilisant l'enzyme malolactique avec le NAD^+ et le manganèse comme co-facteurs. Le CO_2 s'échappe alors par bullage. Dans la cellule, 2 autres voies de dégradation de l'acide malique peuvent également exister. Elles font intervenir la malate déshydrogénase et l'enzyme malique qui catalysent, respectivement, l'oxydation du malate en oxaloacétate et la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate (Figure 3).

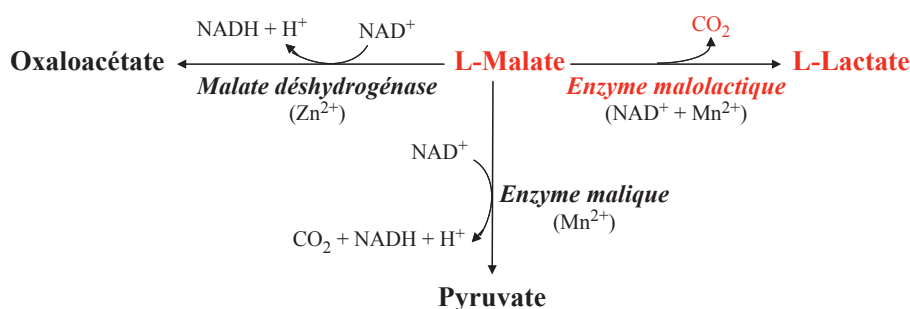


Figure 3 : Voies de transformation du malate chez les bactéries.

Chez *O. oeni*, les travaux de Salema et ses collaborateurs, réalisés sur des vésicules membranaires, montrent que le transport du malate se fait sous forme monoanionique grâce à un uniport. L'entrée du malate dans la cellule serait compensée par la sortie du lactate et du CO_2 . Un symport avec un proton pourrait alors être à l'origine de la création d'un gradient de proton utile à la génération d'énergie et au transport de métabolites (Salema *et al.*, 1994) (Figure 4).

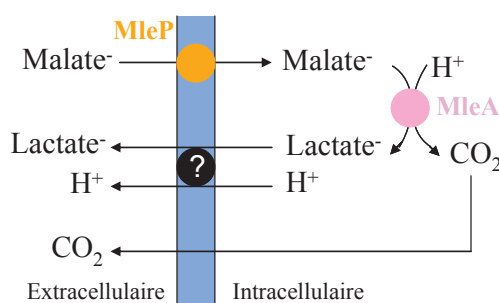


Figure 4 : Mécanisme de transport du malate et du lactate chez *O. oeni* (d'après Alexandre *et al.*, 2006).

En fin de FML, lorsque tout l'acide malique a été dégradé, les microorganismes sont éliminés par sulfitage afin d'éviter l'altération des vins durant leur maturation. A cette étape de fabrication, le dioxyde de soufre (SO_2) peut être utilisé comme agent antimicrobien pour la stabilisation des vins (Chang *et al.*, 1997). Les vins peuvent ensuite être élevés en barriques, collés ou filtrés avant leur mise en bouteille et leur commercialisation.

I.2.2 L'espèce *Oenococcus oeni*

La bactérie lactique *Oenococcus oeni*, anciennement appelée *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967) est recherchée pour réaliser la fermentation malolactique (FML). Elle a été rebaptisée ainsi suite aux travaux de Dicks car elle possède des caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques différentes des autres espèces du genre *Leuconostoc* (Dicks *et al.*, 1995). Cette bactérie appartient au groupe des bactéries lactiques, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Leuconostocaceae*. Un arbre phylogénétique montrant la position de cette espèce au sein des *Lactobacillales* est présenté en Figure 5 (Makarova *et al.*, 2006).

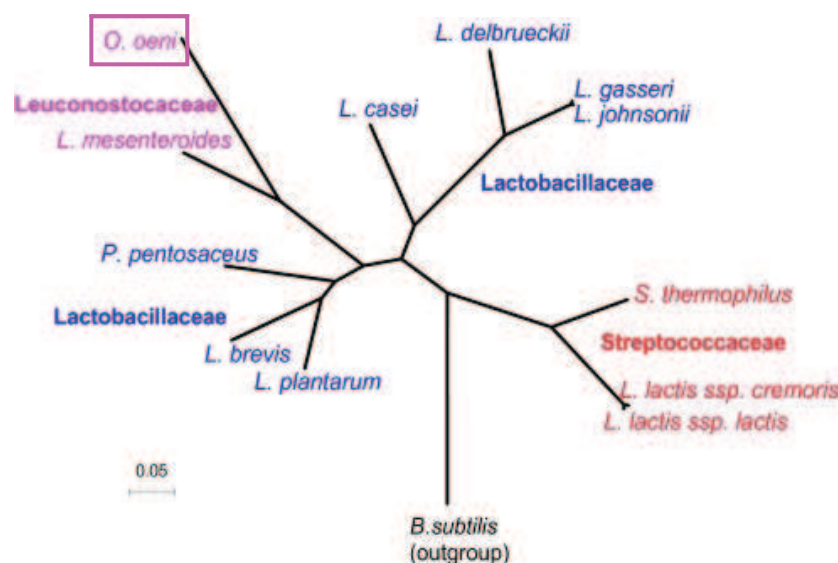


Figure 5 : Arbre phylogénétique des *Lactobacillales* construit suite à l'alignement des séquences concaténées des protéines ribosomales. Les espèces sont colorées comme suit : *Lactobacillaceae* en bleu, *Leuconostocaceae* en violet et *Streptococcaceae* en rouge (figure issue de Makarova *et al.*, 2006).

Le nom de cette bactérie vient du grec *oinos* et *kokkus* et signifie, au sens littéral du terme, « petite chose ronde qui vient du vin ». Jusqu'à très récemment, c'était la seule bactérie appartenant au groupe *Oenococcus* mais il y a peu, une seconde espèce nommée *Oenococcus kitaharae* a été identifiée (Borneman *et al.*, 2012; Endo & Okada, 2006). Cette seconde espèce, incapable de réaliser la fermentation malolactique, est issue d'une boisson alcoolisée japonaise appelée Shōchū.

L'espèce *O. oeni* regroupe une grande diversité de souches qui sont différentes les unes des autres au niveau de leur séquence nucléotidique et de leur contenu génique global (Borneman *et al.*, 2010). Au cours de l'évolution bactérienne, cette espèce semble avoir perdu les gènes *mutS* et *mutL* qui codent pour le système de réparation des mutations dues aux mésappariements (MMR system pour mismatch repair system) (Makarova *et al.*, 2006). Il en résulte alors une accumulation des erreurs spontanées qui ont lieu lors de la réplication de l'ADN et une diminution de la rigueur de recombinaison qui contribuent, toutes deux, à une forte diversité allélique en partie responsable du haut niveau de polymorphisme observé chez *O. oeni* (Marcobal *et al.*, 2008). De plus, les travaux de Bon et ses collaborateurs soulignent la forte abondance ainsi que la diversité de séquences nucléotidiques

d'origine étrangère au sein du génome de cette espèce (Bon *et al.*, 2009). Plus particulièrement, ces auteurs démontrent l'acquisition de nouveaux gènes par intégration horizontale d'éléments mobiles comme par exemple des plasmides, des bactériophages ou encore des transposons. Une partie de ces nouvelles séquences semble provenir de phages et contribuerait ainsi à la diversité des souches chez *O. oeni*. L'acquisition de nouveaux gènes est proposée comme étant une stratégie pour cette bactérie afin de s'adapter à son environnement et semblerait améliorer ses aptitudes technologiques (Bon *et al.*, 2009).

Actuellement, une dizaine de génomes de *O. oeni* ont été séquencés dont 3 sont accessibles dans les bases de données. Il s'agit des souches *O. oeni* PSU-1 (Makarova *et al.*, 2006), *O. oeni* ATCC BAA-1163 (Klaenhammer *et al.*, 2002) et *O. oeni* AWRIB429 (Australian Wine Research Institute, données non publiées). Les génomes de ces bactéries ont une taille d'environ 1,8 Mb et contiennent près de 2000 cadres ouverts de lecture (ORFs) (Borneman *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2005). Les travaux de Borneman et ses collaborateurs ont eu pour but de comparer ces trois génomes. Il ressort de leur étude que 4,8% du génome de la souche PSU-1 a été perdu chez les autres souches de *O. oeni* étudiées. En revanche, aucune corrélation claire entre l'absence de ces ORFs et la capacité de ces souches à se développer dans le vin ou à réaliser la fermentation malolactique n'a pu être établie (Borneman *et al.*, 2010). De plus, une variation de 2% du contenu en GC de leur génome a été observée et pourrait être en lien avec la provenance des gènes exogènes intégrés au sein de leur génome. Cependant, malgré cette forte diversité génétique, une étude récente a pu classer 43 souches de *O. oeni* en 2 groupes (A et B) par électrophorèse en champ pulsé (Bilhère *et al.*, 2009) (Figure 6).

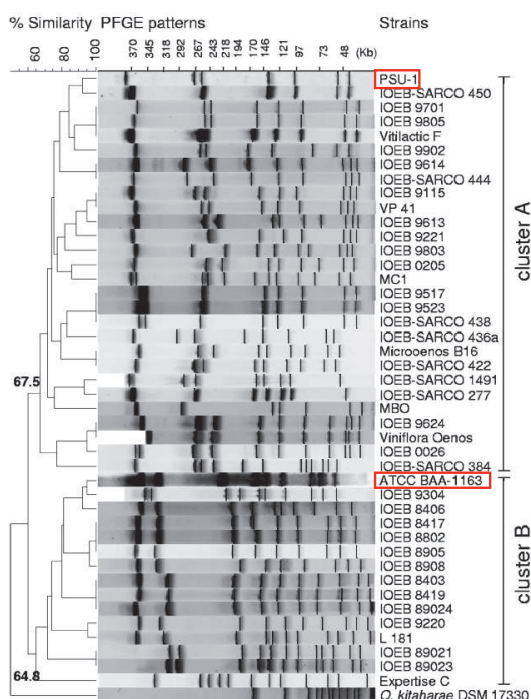


Figure 6 : Arbre phylogénétique classant 43 souches de *O. oeni* suivant leur profil de restriction obtenu par électrophorèse en champ pulsé suite à la digestion de leur ADN génomique par l'enzyme NotI. Le nom des souches PSU-1 et ATCC BAA-1163 dont le génome est disponible dans les bases de données est encadré en rouge (figure issue de Bilhère *et al.*, 2009).

La technique de typage génomique multilocus (MLST), appliquée à 8 gènes de ménage, a également permis à ces auteurs de valider cette image de la population de *O. oeni*. Ces 2 groupes ont ensuite été confirmés par une étude plus large réalisée sur 258 souches qui ont été isolées dans différentes zones géographiques (Bourgogne, Champagne, Aquitaine, Chili, Italie, Afrique du Sud) et sur différents types de vins (rouges, blancs et champagnes) (Bridier *et al.*, 2010). La diversité allélique de ces 2 groupes suggère qu'ils ont évolué séparément.

L'espèce *O. oeni* est une bactérie à Gram positif, non mobile, de forme sphérique à ellipsoïde qui présente un groupement en chaînettes (Figure 7).

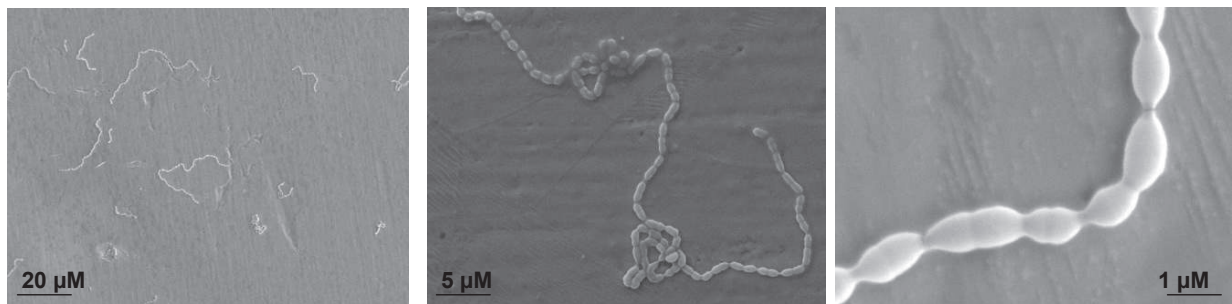


Figure 7 : Images de *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 obtenues en microscopie électronique à balayage.

Cette bactérie acidophile croît lentement entre 20 et 30°C dans des milieux riches comme par exemple le milieu FT80m (Cavin *et al.*, 1989). Les travaux de Dicks et ses collaborateurs décrivent les conditions optimales de croissance de *O. oeni* comme suit : un pH de 4,8 et une température de 22°C (Dicks *et al.*, 1995). Cette bactérie est également capable de se développer en présence d'éthanol (jusqu'à 14% v/v) et de fortes concentrations en SO₂ (< 60 mg.L⁻¹). Ces caractéristiques lui sont indispensables pour croître dans le vin qui est un milieu défavorable à la croissance bactérienne de par son pH faible (entre 2,8 et 3,8 unités pH), sa teneur en éthanol élevée (10 à 16%), sa température basse (caves entre 16 et 18°C), ses carences nutritionnelles importantes et sa teneur en sulfites (50 à 100 mg.L⁻¹).

Lors de ces dernières années, le nombre d'études concernant *O. oeni* a augmenté de manière considérable. En effet, de plus en plus de chercheurs s'intéressent à cette bactérie et cela même en dehors du contexte du vin. Plusieurs études montrent que cette bactérie a des effets bénéfiques sur la santé. Par exemple, certaines souches de *O. oeni* présentent une activité immunomodulatrice. En effet, il a été montré que cette bactérie (i) induit la synthèse *in vitro* de cytokines (IL-10, IL-12, TNFα, IFNγ) chez des cellules sanguines humaines mononuclées (PBMC) et (ii) possède *in vivo* un potentiel anti-inflammatoire qui diminue les symptômes de colite sur le modèle souris. Les auteurs suggèrent alors que *O. oeni* est une bactérie « probiotic-like » (Foligné *et al.*, 2010). Une étude argentine décrit également l'amélioration des propriétés anti-hypertensive et antioxydante d'un vin modèle obtenu en présence de la souche protéolytique *O. oeni* X₂L (Aredes Fernandez *et al.*, 2011). De plus, l'activité

antagoniste de *O. oeni* vis-à-vis d'autres bactéries a également fait l'objet de plusieurs études. En effet, les travaux de Knoll et ses collaborateurs montrent que 8 des souches de *O. oeni* qu'ils ont étudiées possèdent une activité antimicrobienne qui est probablement en relation avec la présence de gènes structuraux codant pour des bactériocines révélés lors d'une analyse *in silico* (Knoll *et al.*, 2008). Par ailleurs, la présence de *O. oeni* peut également inhiber des bactéries pathogènes humaines d'origine alimentaire comme *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* ou encore *Listeria monocytogenes* (Chiang *et al.*, 2012). Une étude montre également que cette bactérie est capable de réduire le 2-octanone en (R)-2-octanol via une anti-Prelog alcool déshydrogénase qui pourrait avoir de nombreuses applications industrielles notamment pour la production de cétones ou d'alcools (Meng & Xu, 2010).

I.2.3 Les impacts de la fermentation malolactique sur les vins

De nombreux travaux réalisés sur la FML ont mis en évidence les modifications qu'elle apporte que ce soit du point de vue visuel, olfactif ou encore sur la composition même du vin. La première conséquence de la FML porte sur la diminution de l'acidité totale du vin. En effet, l'acide malique qui est un diacide possède une acidité très marquée (du type pomme verte) contrairement à l'acide lactique qui est un monoacide plus doux et moins agressif en bouche (Alexandre *et al.*, 2008). En œnologie, on considère alors que cette désacidification biologique permet un assouplissement gustatif des vins. La FML va également avoir un impact sur la couleur des vins car *O. oeni* est capable d'hydrolyser les anthocyanes : cela se traduit alors par l'atténuation de la couleur des vins (Barbagallo *et al.*, 2004). De plus, l'augmentation du pH va modifier les équilibres anthocyaniques en favorisant la proportion des molécules bleues ou incolores (Vivas *et al.*, 1997). La FML apporte aussi des modifications sur la saveur des vins. En effet, une hydrolyse des polysaccharides conduisant à une augmentation du glucose et à la dégradation des tannins rendent les vins moins astringents, plus souples et moins agressifs en bouche. La FML a également un impact positif important sur les arômes des vins qui se traduit par une augmentation de leur complexité. On observe notamment l'apparition de notes beurrées issues du métabolisme de l'acide citrique, de notes fruitées dues à la formation d'esters, de notes végétales produites lors du catabolisme des aldéhydes, de notes de type grillé, café ou pop-corn provenant de l'augmentation de certains composés carbonylés (Alexandre *et al.*, 2008). La FML permet aussi une meilleure stabilité microbienne des vins car elle provoque une élévation de leur pH (entre 0,1 et 0,4 unités pH) et un appauvrissement en éléments nutritifs du milieu dû à la croissance des bactéries lactiques (Lonvaud-Funel, 1999). En revanche, ce développement bactérien peut également être parfois à l'origine de modifications indésirables. En effet, *O. oeni* a la capacité de former du carbamate d'éthyle à partir de l'arginine (Liu & Pilone, 1998) et certaines souches produisent des amines biogènes qui sont issues de la décarboxylation des acides aminés (Lonvaud-Funel, 2001). Ces molécules sont des composés réputés comme cancérigènes et allergènes. L'ensemble des modifications provoquées par la FML sur les vins est fortement dépendant de

nombreux paramètres comme par exemple la souche utilisée, les caractéristiques de départ du vin voire de la baie du raisin, les interactions avec les levures ou encore les conditions de vinification (Lonvaud-Funel, 1999). Il est donc très difficile de prévoir les impacts précis de la FML sur les vins et également quasiment impossible de produire les mêmes vins d'une année sur l'autre.

La Figure 8 résume la complexité des nombreux changements provoqués par la FML sur la composition chimique du vin ainsi que les modifications métaboliques engendrées chez *O. oeni*.

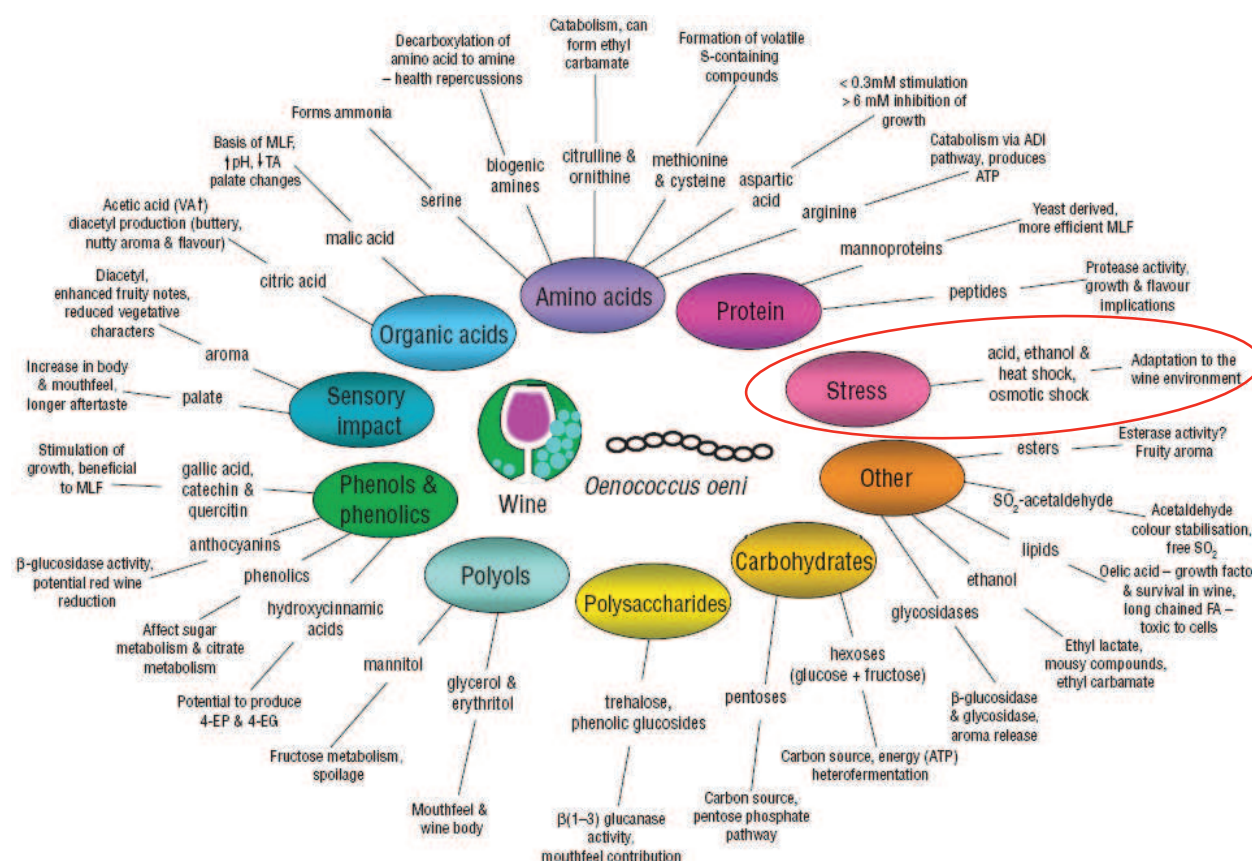


Figure 8 : Les changements biochimiques intervenant lors de la FML et les modifications métaboliques chez *O. oeni* (figure tirée de Bartowsky, 2005). Le cercle rouge indique le positionnement de ce travail de thèse.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la notion de stress. En effet, le milieu vin représente un environnement difficile pour la croissance de *O. oeni*. Nous avons alors étudié les mécanismes d'adaptation mis en place par cette bactérie pour pouvoir se développer dans cette matrice.

1.3. La réponse au stress chez *O. oeni*

O. oeni constitue un bon modèle pour étudier les mécanismes impliqués dans la résistance au stress que ce soit au niveau physiologique ou moléculaire car cette bactérie se développe dans un milieu très difficile qui présente un pH acide, contient de l'alcool, des sulfites, peu de nutriments et possède une température voisine des 18°C. D'une manière plus générale, on peut dire que lorsque les bactéries sont dans leur habitat naturel, elles sont rarement dans leurs conditions optimales de croissance : elles sont

souvent dans un état physiologique défini comme le stress. La notion de stress comprend toutes les modifications physicochimiques des conditions environnementales qui vont modifier la survie des bactéries ou leur taux de croissance. Afin de pouvoir se développer dans ces conditions défavorables les microorganismes vont être capables de mettre en place des mécanismes de réponse au stress qui sont d'ordre physique, physiologique et/ou génétique. Ces phénomènes sont généralement transitoires car ils permettent aux bactéries de s'adapter lors des variations des conditions environnementales. Lorsque les cellules sont acclimatées, les mécanismes activés lors de la réponse au stress reviennent à leur état initial. Chez *O. oeni*, de nombreux mécanismes de réponse au stress ont été mis en évidence. Ils font notamment intervenir l'activation des H^+ -ATPases et de la FML, des modifications au niveau de la membrane visant à maintenir son intégrité et la synthèse de protéines de réponse au stress (Figure 9).

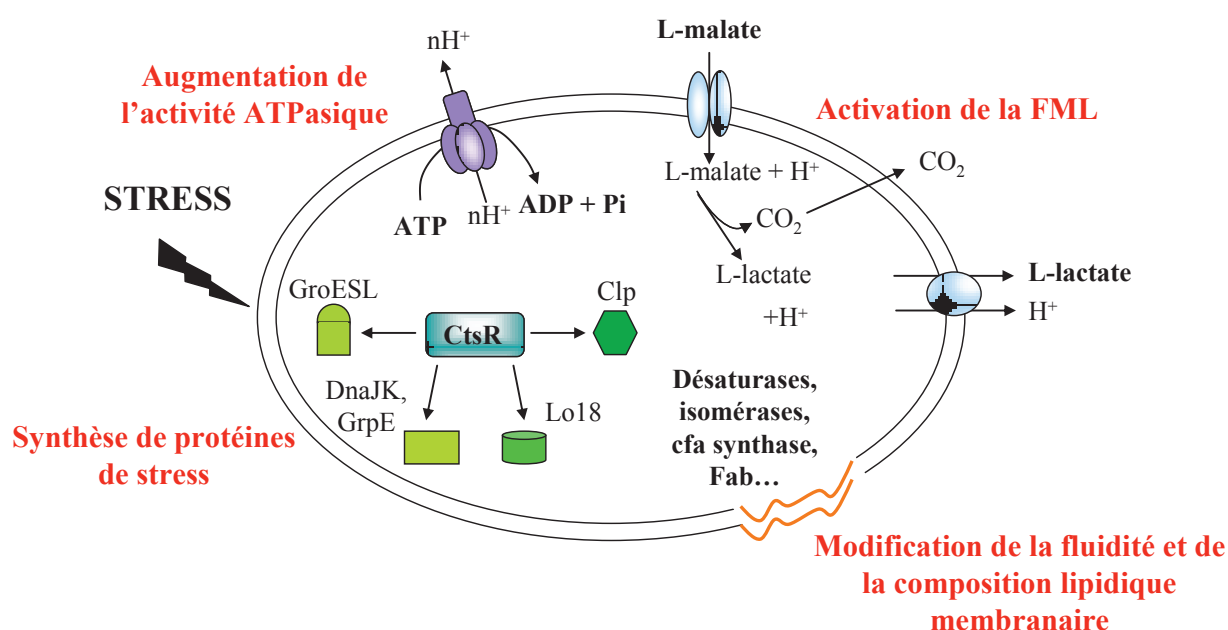


Figure 9 : Les mécanismes de réponse au stress chez *O. oeni*.

I.3.1 L'activation des H^+ -ATPases et de la FML

De nombreux stress, dont l'acidité, peuvent modifier le pH intracellulaire (pH_{int}) des bactéries. Chez *O. oeni*, plusieurs mécanismes ayant pour but de maintenir son pH_{int} ont été caractérisés : il s'agit notamment de l'utilisation des protéines membranaires H^+ -ATPases de type F_1F_0 qui fonctionnent comme des pompes permettant l'exclusion des protons (Hutkins & Nannen, 1993) ou l'activation du système malolactique qui permet le transport du malate et sa décarboxylation (Salema *et al.*, 1996).

Les H^+ -ATPases (ou ATPases de classe V) permettent l'expulsion d'ions H^+ à travers la membrane cytoplasmique (de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule) *via* l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ces pompes à protons ont été bien caractérisées chez les eucaryotes et les procaryotes. Par exemple, chez *E. coli*, elles s'organisent en neuf sous-unités pour la partie F_1 (trois notées α , trois β , une γ , une δ et

une ϵ) et 13 sous-unités pour la partie F_0 (une notée χ , deux ψ et $10 \pm 1 \omega$) (Foster & Fillingame, 1982). L'implication des H^+ -ATPases dans la résistance à l'acidité chez *O. oeni* a été démontrée au laboratoire. En effet, une diminution du pH du milieu de culture de 5,3 à 2,9 provoque 90% de mortalité chez des mutants spontanés de *O. oeni* néomycine-résistants déficients en activité H^+ -ATPase contre 8% pour la souche parentale (Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999). De plus, il a été mis en évidence que ces mutants sont dépourvus d'activité malolactique : aucune transcription des gènes de l'opéron malolactique (*mleA-mleP*) et de la région codant pour son régulateur putatif (*mleR*) n'a été montrée par RT-PCR. En revanche, ce lien entre les H^+ -ATPases et le système malolactique semble être spécifique aux bactéries ayant un comportement acidophile (Galland *et al.*, 2003). Carreté et ses collaborateurs suggèrent que l'activité ATPasique des bactéries constitue un bon marqueur de l'état physiologique des cellules car des stress comme la présence d'éthanol, de cuivre ou encore de sulfites altèrent l'activité de ces pompes à protons et aboutissent à une perte de viabilité cellulaire.

L'utilisation des H^+ -ATPases par *O. oeni* afin de maintenir son pH_{int} est coûteuse en énergie cellulaire car elle implique la consommation d'une molécule d'ATP pour l'expulsion de protons à l'extérieur de la cellule c'est pourquoi cette bactérie peut faire appel à d'autres mécanismes dont l'activation du système malolactique en particulier lorsque le pH du vin est très acide. Comme décrit précédemment (partie I.2.1), la FML permet la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique et joue un rôle important dans la régulation du pH_{int} par la consommation intracellulaire de protons et par leur expulsion avec le lactate nouvellement formé. Elle génère également l'apparition d'une force proton motrice qui est ensuite utilisée par les cellules pour synthétiser de l'ATP (Salema *et al.*, 1996)

I.3.2 Les mécanismes de maintien de l'intégrité membranaire

De manière générale, la plupart des stress environnementaux affectent la fluidité des membranes cellulaires pouvant ainsi conduire jusqu'à la mort des microorganismes. Les bactéries afin de répondre à ces stress sont capables de modifier leur composition en phospholipides membranaires dans le but de maintenir leur fluidité dans un état optimal. Différents mécanismes sont décrits dans la bibliographie. Pour n'en citer que quelques uns, on retrouve la synthèse de nouveaux acides gras faisant notamment intervenir les enzymes codées par les gènes du cluster *fab* (Fatty Acid Biosynthesis) (Lu & Rock, 2006), l'insaturation et la modification des acides gras (Denich *et al.*, 2003) ou encore l'incorporation de cycles propanes *via* l'enzyme CFA synthase (Grogan & Cronan Jr, 1997). Tous ces mécanismes feront l'objet d'une description approfondie dans la partie III de ce chapitre.

I.3.3 La synthèse de protéines de réponse au stress

Les stress environnementaux comme la présence d'éthanol, un pH acide ou encore une variation de température, sont connus pour pouvoir dénaturer les protéines cytoplasmiques en allant même parfois jusqu'à leur agrégation irréversible qui rend alors ces protéines inutilisables par les microorganismes.

Pour contrecarrer les effets délétères de ces stress, les bactéries dont *O. oeni* sont alors capables de synthétiser très rapidement et de façon très abondante des protéines dites de réponse au stress souvent abrégées Hsp pour « Heat Shock Proteins » qui ont un rôle de chaperon moléculaire limitant l'agrégation des protéines cellulaires. Ces protéines ont été découvertes chez *Drosophila melanogaster* où l'augmentation de l'expression d'un groupe de gènes spécifiques suite à un stress thermique a été observée (Ritossa, 1962). Quelques années plus tard, le produit de ces gènes a été appelé Hsp (Tissier *et al.*, 1974). Ces protéines ont ensuite été retrouvées chez de nombreux organismes suite à la présence de stress divers (thermique, UV, osmotique, présence de polluants environnementaux...). Ces protéines, phylogénétiquement conservées, sont regroupées en 3 familles principales suivant leur masse moléculaire : on distingue ainsi les chaperons moléculaires universels, les protéines Clp et les Hsp de faible masse moléculaire (sHsp).

I.3.3.a Les chaperons moléculaires universels

Lors de leur synthèse *de novo*, les protéines bactériennes sont produites sous forme de polypeptides non repliés qui peuvent ensuite acquérir leur forme active spontanément ou être repliés par les chaperons moléculaires universels qui appartiennent aux systèmes Hsp60 (GroESL) et Hsp70 (DnaK/DnaJ/GrpE). Il est important de noter que ces 2 systèmes sont ubiquitaires et très conservés chez les procaryotes et les eucaryotes (cependant ils ont été très peu étudiés chez *O. oeni*). De plus, ils peuvent coopérer et sont très utilisés lors de stress où ils exercent un rôle de chaperon moléculaire ATP-dépendant. En 1993, Hendrick et Hartl décrivent pour la première fois ce terme comme suit : « un chaperon moléculaire est une protéine qui se lie et qui stabilise un autre polypeptide instable, au travers de cycles de fixation et de libération régulés, et facilite le repliement et l'assemblage correct de ce polypeptide » (Hendrick & Hartl, 1993). Ces 2 systèmes reconnaissent les surfaces hydrophobes des peptides dépliés mais utilisent ensuite des mécanismes de repliement différents.

Tout d'abord le système Hsp60, composé de 2 partenaires GroEL (ou Hsp60) et son co-chaperon GroES (Hsp10), utilise le cycle de repliement présenté en Figure 10.

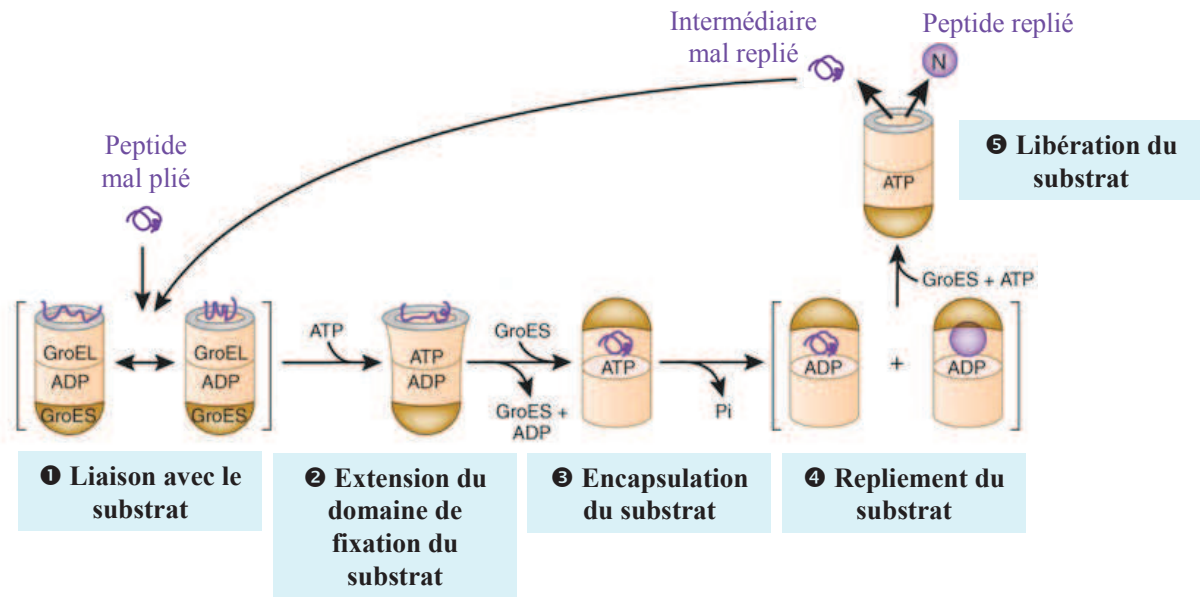


Figure 10 : Modèle présentant le cycle de repliement d'un peptide par le système chaperon GroEL/GroES (d'après Hartl et Hayer-Hartl, 2009).

Dans un premier temps, il y a liaison du peptide mal plié qui est sous forme étendue ou compacte avec GroEL (❶). Les régions hydrophobes du substrat sont étirées et les régions moins stables sont compactées de façon partielle grâce à un mouvement ATP-dépendant du domaine apical de GroEL (❷). La protéine GroES se lie ensuite au complexe substrat-GroEL où elle forme comme un couvercle afin d'encapsuler le substrat et d'éviter sa fuite (❸). Le polypeptide est replié dans la cavité centrale formée par GroEL et GroES qui contient un environnement protecteur facilitant ainsi le repliement; ce processus dure environ 10 secondes (❹). La libération du ligand est déclenchée par un signal allostérique produit par la dissociation de GroES et le départ de l'ADP (❺). Si le substrat est mal replié il peut de nouveau être pris en charge par le système Hsp60 pour un nouveau cycle de repliement. Le bon déroulement de ce cycle nécessite la liaison et l'hydrolyse de sept molécules d'ATP pour le pliage et l'expulsion du substrat dont la taille est limitée par le volume de la cavité centrale : ce système est utilisé pour les polypeptides de 20 à 60 kDa et reconnaît *in vitro* environ 50% des protéines solubles de *E. coli* (Hartl & Hayer-Hartl, 2009; Hartl *et al.*, 2011; Houry, 2001; Skjaerven *et al.*, 2011).

La structure quaternaire du complexe GroEL-GroES a été déterminée chez *E. coli* en 1997 par Xu et ses collaborateurs (Figure 11) (Xu *et al.*, 1997). GroEL est organisée en une structure cylindrique composée de deux anneaux superposés notés *cis* et *trans* en fonction de la position de GroES. Chaque anneau de GroEL est composé de sept sous-unités contenant chacune une région équatoriale, intermédiaire et apicale (respectivement coloriées en bleu, vert et rouge dans la Figure 11). GroES est également heptamérique.

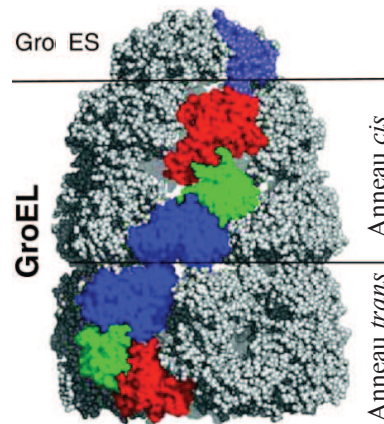


Figure 11 : Structure du complexe GroEL-GroES de *E. coli* (Xu et al., 1997).

Le système Hsp70 (souvent abrégé machinerie KJE) fait appel à la protéine DnaK (Hsp70) qui travaille de concert avec deux cochaperons qui sont les protéines DnaJ (Hsp40) et GrpE. Ces trois protéines sont utilisées par les cellules en conditions optimales de croissance afin de donner une structure active aux protéines juste après leur synthèse et sont très largement surexprimées lors de stress (notamment thermique) (Narberhaus, 2002). Un exemple de repliement d'un peptide par ce système est présenté dans la Figure 12.

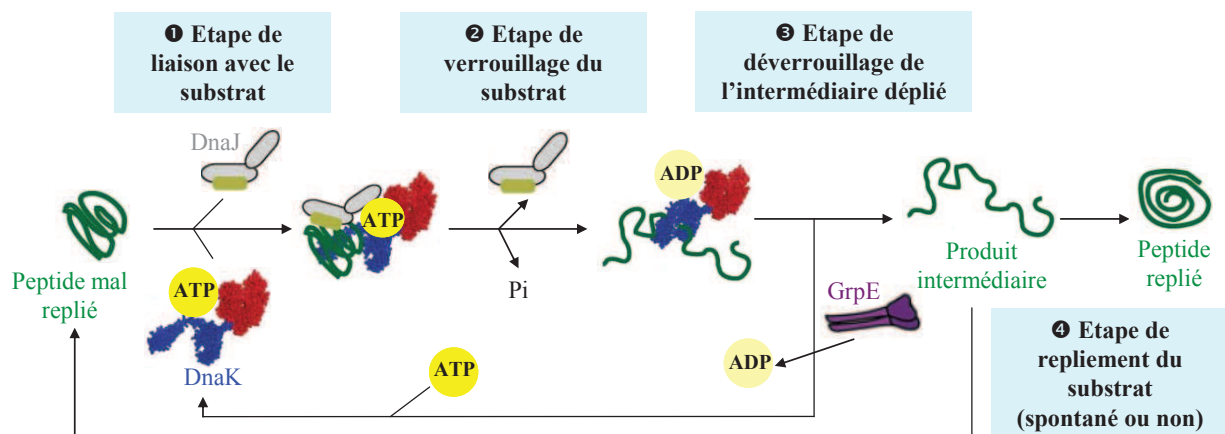


Figure 12 : Schéma représentant le cycle de repliement d'un peptide par le système chaperon DnaK/DnaJ/GrpE (adapté de Genevax et al., 2007 et Sharma et al., 2010).

Dans un premier temps, la protéine DnaK (sous forme monomérique liée à l'ATP) et son co-chaperon dimérique DnaJ s'associent au peptide mal plié qui est de préférence de masse moléculaire élevée (> 60 kDa) (❶). Cette interaction provoque un changement structural du domaine ATPasique de DnaK et augmente son affinité pour le substrat. Cette modification de conformation permet ainsi de piéger de façon hermétique le substrat dans une cavité et entraîne l'hydrolyse de l'ATP (❷). Ensuite, la protéine GrpE sous forme dimérique fonctionne comme un facteur d'échange nucléotidique en catalysant la libération de l'ADP fixé sur DnaK et en le remplaçant par une molécule d'ATP. Ceci altère la structure tridimensionnelle de DnaK et il en résulte une faible affinité pour le substrat qui est alors délivré sous forme d'un intermédiaire peptidique déplié (❸). Le substrat peut alors être replié sous forme active de façon spontanée ou, en cas d'échec, être de nouveau pris en charge par le système

Hsp70 pour un nouveau cycle de repliement (④) (Genevaux *et al.*, 2007; Harrison, 2003; Houry, 2001). Sharma et ces collaborateurs ont montré que, dans leurs conditions expérimentales, cinq molécules d'ATP étaient consommées par DnaK afin de replier sous forme active une molécule de luciférase dénaturée soit un coût en ATP 1 000 fois plus faible pour la cellule que celui nécessaire pour dégrader et re-synthétiser la protéine mal formée en question (Sharma *et al.*, 2010).

Chez certaines bactéries, comme *Listeria monocytogenes* ou encore *E. coli*, le système chaperon DnaK/DnaJ/GrpE peut travailler en association avec une autre protéine de stress de la famille des Hsp100 appelée ClpB ou Hsp104 (Figure 13).

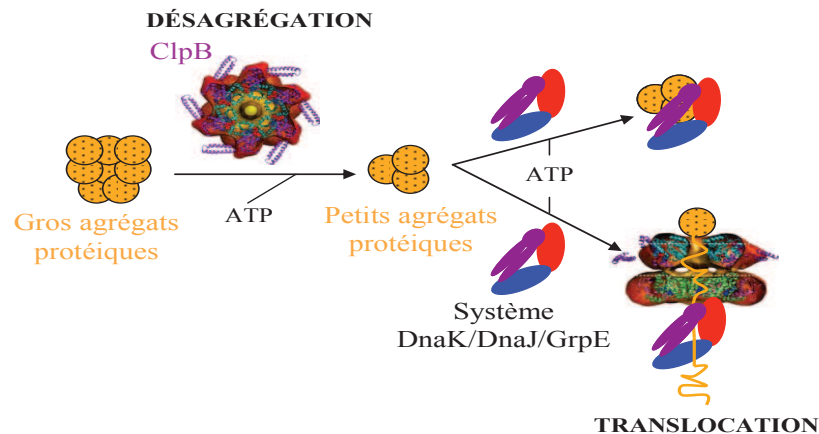


Figure 13 : Modèle de désagrégation protéique par ClpB (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

ClpB ne participe pas au repliement des protéines mais elle est capable de désagréger les gros agrégats de protéines précipitées contenues dans les corps d'inclusion. Ensuite, les petits agrégats protéiques ainsi formés seront soit directement reconnus par le système chaperon DnaK/DnaJ/GrpE, soit ils entreront dans la cavité de l'hexamère ClpB puis seront transférés au système chaperon DnaK/DnaJ/GrpE (Figure 13) (Doyle & Wickner, 2009; Goloubinoff *et al.*, 1999; Zolkiewski *et al.*, 2012). Cependant ClpB ne semble pas être présente chez toutes les bactéries car aucun gène codant pour cette protéine n'a encore été identifié chez *B. subtilis* ni chez *O. oeni*.

I.3.3.b Les protéines Clp

La littérature décrit de nombreuses protéines Clp (pour Caseinolytic proteins ou Hsp100) qui sont très conservées chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Dans cette partie, nous nous focaliserons uniquement sur les Clp présentes chez *O. oeni*. Suite à une étude du génome de *O. oeni* cinq protéines Clp ont été mises en évidence (Sugimoto & Sonomoto, 2008) dont une seule est de type protéase : c'est ClpP et quatre sont de type ATPases : il s'agit de ClpC, ClpL également appelée ClpL1, ClpL2 et ClpX.

La protéine ClpP est une protéase à sérine impliquée dans les phénomènes de sporulation, de compétence ou encore la croissance à haute température (Msadek *et al.*, 1998). Sa structure

oligomérique a été élucidée chez cinq organismes différents : *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Plasmodium falciparum* (l'agent responsable de la malaria), *Mycobacterium tuberculosis* et chez l'humain. Les structures de ClpP obtenues sont très similaires et s'organisent en une structure cylindrique de 14 sous-unités regroupées en deux disques heptamériques qui entourent une large cavité (Yu & Houry, 2007). La structure de ClpP de *E. coli* est présentée en Figure 14.

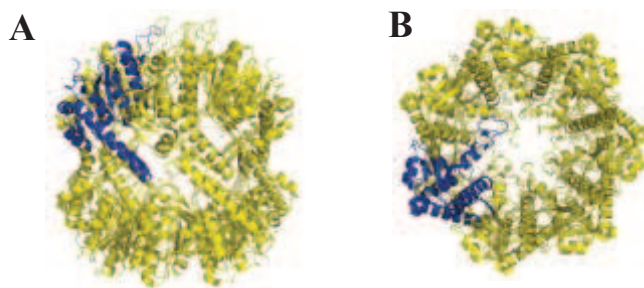


Figure 14 : Structure de ClpP de *E. coli* obtenue aux rayons X (A : vue de côté, B : vue de dessus) (Yu et Houry, 2007).

ClpP est capable de former des complexes avec des protéines chaperons de type AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) parmi lesquelles on retrouve ClpC (qui est l'équivalent de ClpA chez les bactéries à Gram négatif), ClpL et ClpE afin de dégrader les protéines mal pliées en peptides de sept à huit résidus (Yu & Houry, 2007). Sans la présence de ces ATPases, seuls des petits peptides entrent dans la chambre protéolytique de ClpE et leur dégradation se fait très lentement (Molière & Turgay, 2009). L'entrée des gros peptides semble bloquée par la partie N-terminale de ClpP (Kress *et al.*, 2009). L'introduction du substrat se fait par les pores axiaux du cylindre qui contient plusieurs sites actifs chacun composés de trois résidus d'acides aminés (sérine, histidine et acide aspartique) ; chez *E. coli* on dénombre jusqu'à 14 sites protéasiques dans la même cavité (Kress *et al.*, 2009). Récemment, Kirstein et ses collaborateurs ont montré que ClpP est sensible à des antibiotiques cycliques composés d'acyldepsipeptides (ADEPs) qui provoquent la dissociation des complexes ClpP-ATPases. De plus, sous l'effet de cette drogue, ClpP dégrade de façon anarchique les protéines non repliées comme par exemple les chaînes peptidiques émergeant des ribosomes (Kirstein *et al.*, 2009).

Les ATPases possèdent une double activité : (i) se sont des chaperons moléculaires ATP-dépendants et (ii) lorsque qu'elles sont associées à ClpP elles régulent l'activité protéolytique en reconnaissant les substrats dénaturés, en les déroulant et en les dirigeant à travers un pore étroit dans la chambre protéolytique de la protéase ClpP pour leur dégradation (Doyle & Wickner, 2009; Kress *et al.*, 2009) (Figure 15).

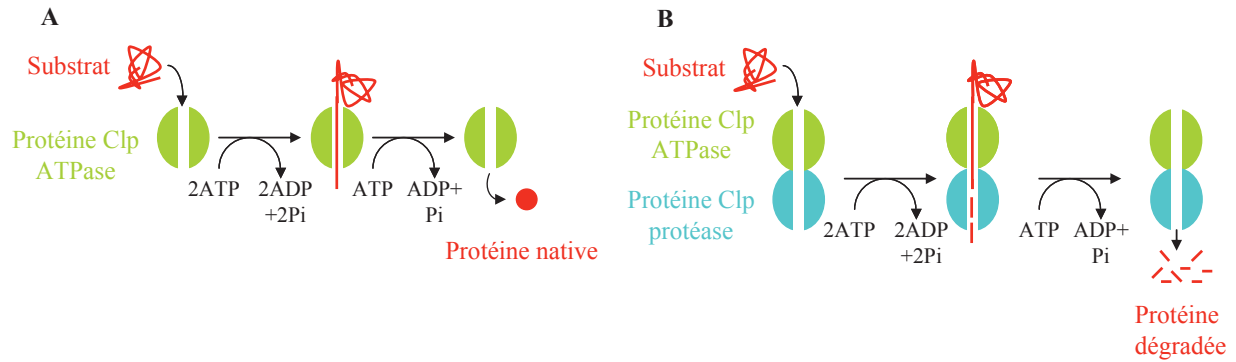


Figure 15 : Mécanismes d'action des protéines Clp. (A) Repliement d'un substrat par une protéine Clp ATPase, (B) Dégradation d'un substrat par le complexe ATPase/protéase (d'après Doyle *et al.*, 2009).

Les ATPases possèdent un module très conservé d'environ 230 acides aminés appelé P-loop qui contient des motifs caractéristiques conservés : un motif appelé Walker A impliqué dans la liaison à l'ATP (noté NBD pour Nucleotide Binding Domain), un motif Walker B ayant un rôle important dans la liaison aux métaux et la catalyse de l'ATP, des motifs senseurs un et deux ainsi qu'un motif en doigt arginine (Houry, 2001; Kress *et al.*, 2009). Les ATPases sont organisées en deux classes différentes. La classe I regroupe celles qui possèdent deux NBD et dont l'assemblage oligomérique nécessitent la présence de nucléotides (Lee & Tsai, 2005) : il s'agit de ClpC, ClpE et ClpL. Le système ClpCP a été particulièrement étudié chez les bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* où il intervient principalement dans la régulation de la réponse au stress *via* la dégradation du répresseur CtsR (Molière & Turgay, 2009) (voir partie II.5). Concernant ClpEP, en plus de sa participation dans la désagrégation protéique de la cellule, ce système est impliqué dans la déstabilisation de CtsR chez *Bacillus subtilis* (Miethke *et al.*, 2006). ClpE est spécifique des bactéries à Gram positif où elle participe à la virulence chez *L. monocytogenes* et *S. pneumoniae* (Nair *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009) et à la division cellulaire chez *L. monocytogenes* (Nair *et al.*, 1999). Le complexe ClpLP participe aussi à la dégradation de CtsR mais cette fois-ci chez *Streptococcus mutans* (Tao *et al.*, 2012). La protéine ClpL est présente uniquement chez les bactéries à Gram positif et joue des rôles très divers comme la protection cellulaire et la détoxification chez *Lactobacillus casei* (Hamon *et al.*, 2012), l'augmentation de la tolérance à la bile chez *S. pneumoniae* (Tran *et al.*, 2011) ou encore la virulence chez *S. mutans* (Kajfasz *et al.*, 2009). L'ATPase ClpX appartient quant à elle à la classe II car elle ne possède qu'un seul NBD et a été beaucoup décrite chez *E. coli*. Le complexe ClpXP dégrade les substrats qui possèdent des séquences spécifiques en leur partie C-terminale parmi lesquelles on distingue le tag SsrA (Baker & Sauer, 2011).

1.3.3.c Les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire chez *O. oeni*

Afin de s'adapter aux conditions environnementales stressantes, les microorganismes ont la capacité de synthétiser des protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire (sHsp). La partie II de ce

chapitre sera ensuite dédiée aux connaissances concernant ces protéines, à leur structure et à leurs fonctions.

A ce jour, un seul gène codant pour les sHsp a été identifié dans le génome de *O. oeni* : il s'agit du gène *hsp18* qui code pour la protéine de stress Lo18. Cette sHsp est produite en réponse à de nombreuses conditions de stress rencontrées dans le vin (éthanol, sulfite, phase stationnaire...). La partie II.5 lui sera entièrement consacrée.

II. Les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire (sHsp)

Dans cette partie consacrée aux sHsp, nous nous intéresserons aux structures oligomériques, aux fonctions mais également aux localisations cellulaires de ces protéines de stress quelles soient eucaryotes ou procaryotes.

II.1. Généralités sur les sHsp

II.1.1 Les sHsp : des protéines ubiquitaires

Au cours du temps, les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire (ou small Heat shock proteins) ont porté plusieurs appellations : α -Hsp, smHsp ou encore sHsp. Elles sont similaires aux protéines α -cristalline A (HspB4) et α -cristalline B (HspB5) majoritairement retrouvées dans le cristallin de l'oeil chez les vertébrés (Brady *et al.*, 1997). Ce sont des protéines ubiquitaires retrouvées chez l'Homme, les animaux, les plantes, les bactéries mais aussi chez les archaebactéries. La présence des sHsp chez tous ces organismes montre clairement leur importance biologique. Néanmoins, elles ne sont pas présentes chez tous les microorganismes. En effet, il apparaît que pour certaines bactéries ayant un petit génome comme *Helicobacter pylori* 26695 (1,66 Mb), *Mycoplasma pneumoniae* M129 (0,81 Mb) ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (2,37 Mb), aucun gène codant pour une ou plusieurs sHsp n'a pu être identifié (Narberhaus, 2002). En revanche, il s'avère que chez les organismes possédant un génome relativement large, comme par exemple *B. subtilis* 168 (4,2 Mb) ou *Bradyrhizobium japonicum* 110 (8,7 Mb), la présence de multiples sHsp a été observée leur permettant ainsi de se développer dans des niches écologiques très diversifiées (Narberhaus, 2002). Récemment, Han et ses collaborateurs ont recensé toutes les sHsp connues chez les archaebactéries et les bactéries dont le génome est séquencé (Han *et al.*, 2008).

Dans la plupart des cas, la délétion de gènes codant pour des sHsp s'avère dramatique pour les microorganismes. Par exemple, l'interruption du gène *hsp16.6* chez *Synechocystis* PCC 6803, une cyanobactérie d'eau douce, provoque une diminution significative du taux de croissance et réduit fortement l'activité photosynthétique de cette cyanobactérie lors d'un stress thermique (Lee *et al.*, 2000). De plus, la délétion du gène *hsp18* chez *Streptomyces albus* provoque une perturbation importante de la thermotolérance chez cette bactérie filamenteuse à Gram positif (Servant & Mazodier, 1995).

II.1.2 Les caractéristiques des sHsp

Les sHsp présentent des caractéristiques communes qui sont : (i) une augmentation très importante et rapide de leur synthèse lors de stress environnementaux, (ii) une taille de monomère allant de 12 à

43 kDa, (iii) la présence d'un domaine d'environ 100 acides aminés relativement conservé au sein des espèces appelé domaine α -cristallin, (iv) une capacité à s'organiser en larges structures oligomériques, (v) une localisation cellulaire variée et enfin (vi) elles possèdent un rôle de chaperon moléculaire ATP-indépendant qui a été mis en évidence au début des années 1990 (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993).

En plus de leur rôle dans la réponse au stress, les sHsp sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la thermotolérance (Laksanalamai *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 1997), le développement de certaines maladies humaines (Brownell *et al.*, 2012; Clark & Muchowski, 2000; Garrido *et al.*, 2012), la sporulation (Reischl *et al.*, 2001) ou encore la pathogénicité microbienne (Li *et al.*, 2010; Stamler *et al.*, 2005). Cependant, il est important de souligner que l'intervention des sHsp dans tous ces processus est sûrement liée à leur rôle de protection des autres protéines qui pourraient être altérées pendant ces diverses activités.

II.1.3 Les localisations cellulaires des sHsp

La plupart des sHsp possède une localisation cytoplasmique mais des différences de localisation considérables sont observées au sein des organismes. En effet, les sHsp peuvent être retrouvées en interaction avec les membranes. Par exemple, la protéine de stress Hsp16.3 est un antigène de surface de la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis*, également appelée bacille de Koch, qui est l'agent responsable de la tuberculose (Chang *et al.*, 1996). Cette protéine devient majoritaire dans les membranes bactériennes lors de la phase stationnaire de croissance ou pendant l'infection des macrophages par ce microorganisme (Yuan *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1998). Une portion des isoformes protéiques α -cristallins A et B est également localisée au niveau de la membrane plasmique des lentilles oculaires suggérant leur implication dans le maintien de l'intégrité membranaire d'un des organes les plus sensibles au stress (Cobb & Petrash, 2000). L'interaction entre les sHsp et les membranes sera détaillée dans la partie III.3.2.b.

Les sHsp peuvent également s'associer aux éléments du cytosquelette des cellules eucaryotes comme les microfilaments, les filaments intermédiaires ou encore les microtubules. En effet, Perng et ses collaborateurs, ont par exemple montré que les protéines Hsp27 et α -cristalline B interagissent avec les filaments intermédiaires afin de participer à la formation du réseau et la régulation de l'organisation spatiale du cytosquelette (Perng *et al.*, 1999a; Perng *et al.*, 1999b).

De plus, quelques études décrivent aussi que les sHsp sont retrouvées au niveau du noyau chez les organismes eucaryotes. Par exemple, les sHsp appartenant à la classe III ont une localisation nucléocytoplasmique chez le riz, la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Siddique *et al.*, 2003). Il en est de même pour la protéine α -cristalline A modifiée, où l'arginine du domaine α -cristallin située en position 49 a été remplacée par une cystéine, qui se retrouve alors anormalement liée au chromosome humain n°21 (Mackay *et al.*, 2003). Les auteurs

suggèrent alors que cette protéine modifiée, qui peut se transmettre de façon héréditaire, pourrait être impliquée dans la détérioration de la vue et l'apparition de cécité infantine.

II.2. La séquence protéique des sHsp

La séquence protéique des sHsp consiste en trois régions distinctes qui sont divisées en un domaine α -cristallin central qui est précédé d'une région N-terminale et suivi d'une courte extension C-terminale. Les sHsp présentent une faible similarité de séquence que ce soit entre les divers organismes où elles sont retrouvées (Figure 16) ou au sein de différentes sHsp d'un même organisme comme le souligne l'alignement de séquences de 67 sHsp bactériennes et archeabactériennes réalisé par Narberhaus en 2002. Cet alignement n'identifie en effet que très peu de motifs conservés au sein de leur séquence protéique.

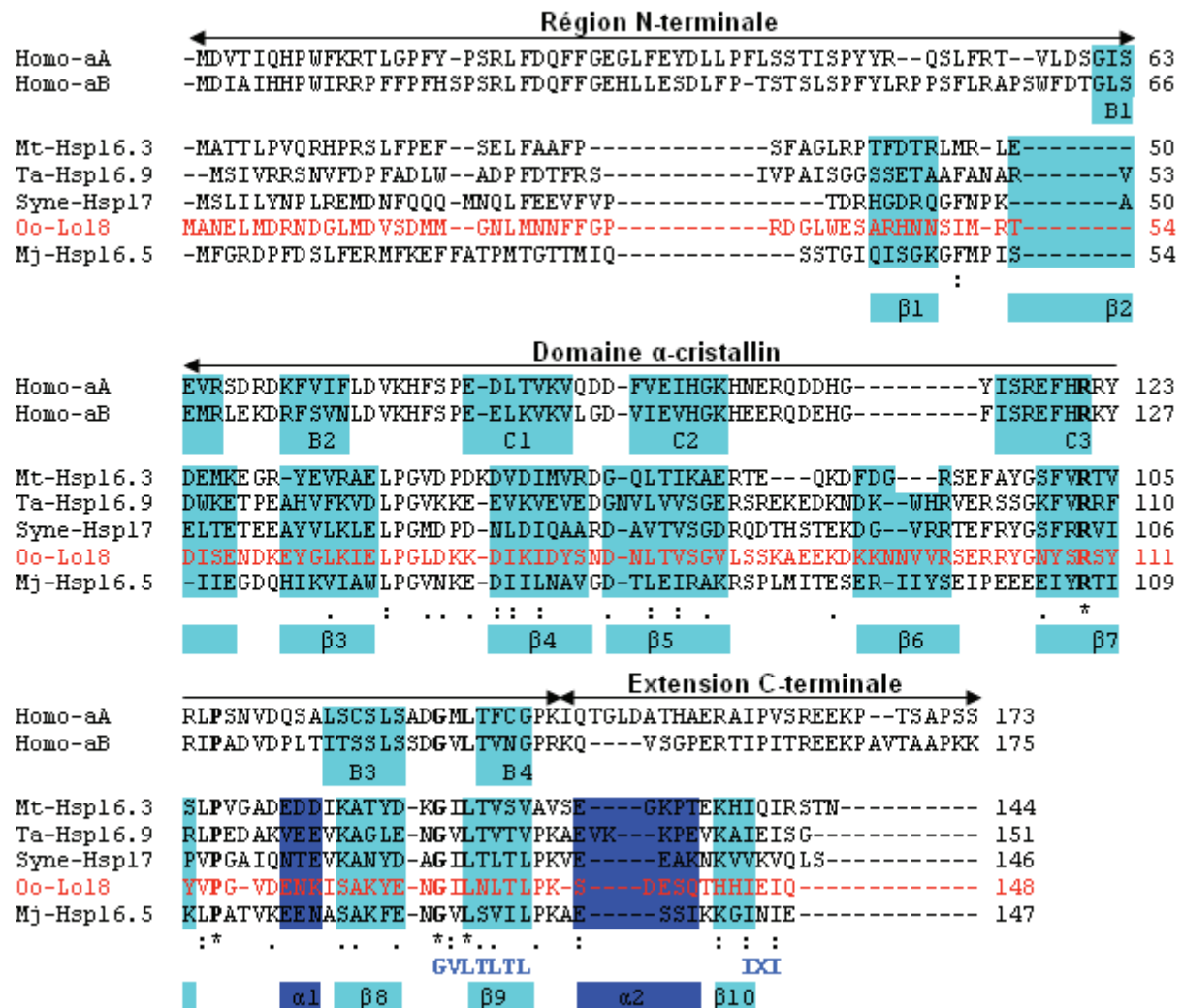


Figure 16 : Alignement de séquences protéiques de sHsp humaines, eucaryotes et procaryotes (réalisé avec ClustalW). Les abréviations utilisées pour les sHsp sont les suivantes : Homo-aA : protéine α -cristalline A humaine (P02489), Homo-aB : protéine α -cristalline B humaine (P02511), Mt-Hsp16.3 : Hsp16.3 de *M. tuberculosis* (P0A5B7), Ta-Hsp16.9 : Hsp16.9 de *T. aestivum* (P12810), Syne-Hsp17 : Hsp17 de *Synechocystis* (P72977), Oo-Lo18 : Lo18 de *O. oeni* (A0NLC2), Mj-Hsp16.5 : *M. jannaschii* (Q57733). La séquence de Lo18 de *O. oeni* est écrite en rouge. Les symboles *, : , . indiquent respectivement des résidus d'acides aminés identiques à 100, 80 ou 60%. Les séquences des structures secondaires surlignées en bleu et

turquoise montrent la position des feuillets β et des hélices α (d'après (Koteiche & Mchaourab, 1999) pour les protéines α -cristallines humaines et d'après la séquence de la protéine cristallisée Hsp16.5 de *M. jannaschii* pour les autres sHsp). Les séquences consensus des motifs conservés GVLTL/VTL/V et I/LXI/L sont notées en bleu.

Dans les parties suivantes, nous allons nous intéresser aux trois régions composant les sHsp et à leurs rôles en terme de structure et de fonctions.

II.2.1 La région N-terminale

La région N-terminale des sHsp est très variable du point de vue de sa taille (allant de 20 à 250 acides aminés) et de sa séquence au sein des différents organismes chez lesquels les sHsp sont présentes. Cette région très peu conservée comporte tout de même deux segments hélicoïdaux impliqués dans l'oligomérisation des sHsp car ils peuvent établir des interactions hydrophobes avec le domaine α -cristallin. La délétion de la totalité ou d'une partie de cette région provoque l'altération de la structure des sHsp conduisant fréquemment à leur agrégation (Basha *et al.*, 2011). La partie N-terminale joue donc un rôle important dans l'organisation et la stabilisation des oligomères mais possède également une fonction prépondérante dans l'échange dynamique des sous-unités et dans l'activité chaperon des sHsp (Eifert *et al.*, 2005; Giese *et al.*, 2005; Jaya *et al.*, 2009; McDonald *et al.*, 2012; Sun & MacRae, 2005a). Par ailleurs, plusieurs articles relatent le rôle de l'évolution de cette partie dans la spécificité de reconnaissance des substrats (Basha *et al.*, 2006; Giese *et al.*, 2005; Jaya *et al.*, 2009). Cette région semble cachée à l'intérieur des structures oligomériques comme notamment chez Hsp16.9 du blé car elle est très hydrophobe (van Montfort *et al.*, 2001). En revanche, des mutations effectuées dans cette région chez Hsp17 de *Synechocystis* ne semblent pas impacter son oligomérisation ni son activité chaperon mais elles affectent la répartition cytoplasme / membrane de la protéine (Balogi *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent donc que la partie N-terminale est également impliquée dans la liaison aux membranes.

II.2.2 Le domaine α -cristallin

Le domaine α -cristallin des sHsp est une région relativement conservée au cours de l'évolution. Il contient sept feuillets β , une hélice α et un motif très conservé situé dans sa partie C-terminale possédant la séquence consensus suivante : GVLTL/VTL/V. Ces structures primaire et secondaire ont des rôles très importants dans la dimérisation des sHsp (Haslbeck *et al.*, 2005; Sun & MacRae, 2005a) et contribuent à la structure et aux fonctions des sHsp. La caractérisation du domaine α -cristallin a notamment été possible grâce à des études utilisant des délétions ou des mutations dirigées changeant la séquence des sHsp permettant ainsi de déterminer son rôle dans l'oligomérisation et de comprendre quels sont les acides aminés responsables de l'activité chaperon. Par exemple, Lentze et ses collaborateurs ont réalisé une étude structure-fonction pour mettre en évidence l'impact d'une mutation de la phénylalanine en position 94 de HspH de *Bradyrhizobium japonicum* (Lentze *et al.*,

2003). Il s'avère que la modification de cet acide aminé en alanine perturbe la structure oligomérique en conduisant à la formation de petits oligomères d'environ 25 kDa (contrairement à des structures de taille supérieure à 300 kDa pour la protéine sauvage) et a un effet drastique sur l'activité chaperon de HspH. Cette mutation, située près d'un site putatif de dimérisation, a donc un effet perturbateur sur l'interaction entre les monomères de cette sHsp. En revanche, la modification de l'alanine conservée en position 114 supprime cette fois-ci l'activité chaperon de HspH sans affecter son oligomérisation (Lentze *et al.*, 2003). Il semblerait donc que cet acide aminé soit impliqué dans l'interaction entre cette sHsp et ses substrats. En 2010, Weidmann et ses collaborateurs, ont étudié chez la sHsp Lo18 de *O. oeni*, l'effet de mutations ciblées basées sur les travaux de Lentze cités précédemment (Weidmann *et al.*, 2010). Ils ont alors obtenus la protéine Y107A qui correspond à celle appelée F94A chez HspH. Une étude structure-fonction réalisée sur cette protéine montre alors que Y107A conserve sa structure et son activité chaperon contrairement à F94A. Ceci suggère que des acides aminés localisés aux mêmes endroits chez 2 sHsp différentes peuvent avoir des rôles distincts.

II.2.3 L'extension C-terminale

L'extension C-terminale des sHsp est une région de taille souvent inférieure à 20 acides aminés qui est flexible et riche en acides aminés polaires et chargés comme le glutamate, la lysine ou encore l'isoleucine. Cette partie exposée vers l'extérieur est extrêmement variable à l'exception d'un motif I/L-X-I/L qui est relativement constant au sein des espèces. En effet, cette séquence est présente chez 96% des sHsp référencées dans les bases de données (Poulain *et al.*, 2010). Ce motif est impliqué dans l'oligomérisation des sHsp *via* des interactions de type hydrophobe avec le domaine α -cristallin permettant des associations inter-dimériques (Laksanalamai & Robb, 2004; Poulain *et al.*, 2010; Studer *et al.*, 2002; Sun & MacRae, 2005a). La perte de 11 acides aminés du côté C-terminal conduit, chez la protéine IbpB de *E. coli*, à sa dimérisation et à la perte de son activité chaperon (Jiao *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'élimination des 10 derniers acides aminés de la partie C-terminale chez la protéine humaine α -cristalline A (Bova *et al.*, 2000). De plus, ces auteurs ont également observé que lorsque de plus grandes parties sont tronquées, les conséquences en terme de multimérisation et d'activité sont plus importantes. Actuellement, aucune étude ne relate l'implication de la partie C-terminale des sHsp dans la liaison à la membrane des cellules. En revanche, chez les Hsp, Torok et ses collaborateurs ont souligné le rôle de cette région dans l'association de GroEL avec des vésicules lipidiques (Torok *et al.*, 1997).

Pour résumer, il semblerait que l'extension C-terminale des sHsp soit impliquée dans leur oligomérisation mais cette région ne semble pas avoir de rôle direct dans la liaison aux substrats.

II.3 L'oligomérisation des sHsp

II.3.1 La diversité des structures oligomériques des sHsp

Une des caractéristiques communes des sHsp est leur capacité à s'assembler en larges complexes oligomériques. A ce jour, uniquement deux structures de sHsp ont été élucidées par cristallisation et diffraction des rayons X. La première structure résolue est celle de la protéine Hsp16.5 de l'archaebactérie thermophile *Methanococcus jannaschii* (maintenant renommée *Methanocaldococcus jannaschii*) (code d'accèsion PDB 1SHS) (Kim *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998b). Cette sHsp s'organise sous forme d'un complexe homogène de 24 sous-unités suivant une symétrie octaédrique (Figure 17 A). Cette sphère possède une cavité centrale ayant un diamètre de 6,5 nm permettant l'entrée de petites molécules comme par exemple des peptides. Chaque monomère est composé de (i) neuf brins β (numérotés de 1 à 9) qui s'organisent en une structure dite sandwich β formée par deux feuillets β antiparallèles, (ii) d'un petit brin β contenu dans la partie C-terminale (β 10) et (iii) de deux hélices α notées α 1 et α 2. La seconde structure cristalline de sHsp, obtenue avec une résolution de 2,7 Å, est celle de Hsp16.9 du blé (*Triticum aestivum*) (code d'accèsion PDB 1GME) (van Montfort *et al.*, 2001). Cette protéine s'assemble sous la forme d'un disque dodécamérique organisé en 2 disques de 3 dimères (Figure 17 B et C).

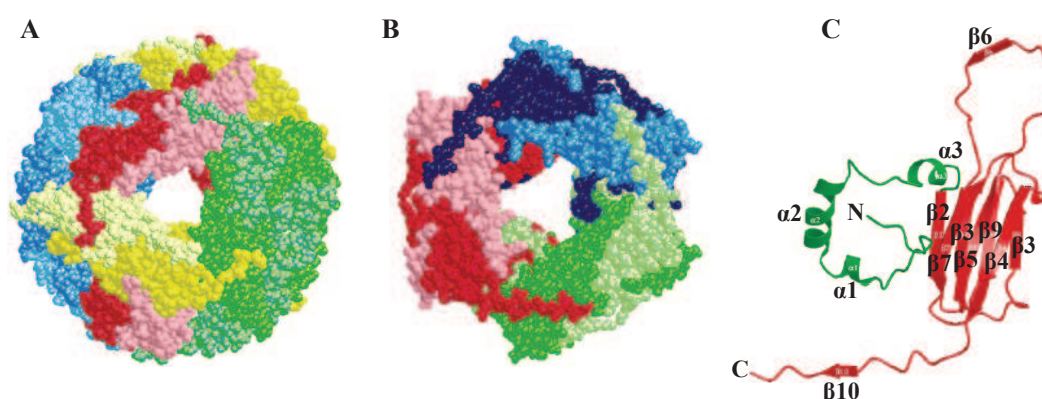


Figure 17 : Structures cristallines des sHsp Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* (A) et de Hsp16.9 du blé (B), (C) monomère de Hsp16.9 (d'après van Montfort *et al.*, 2001).

Depuis quelques années, d'autres structures quaternaires ont été obtenues avec de hautes résolutions, grâce aux techniques de cristallisation et de spectroscopie RMN du solide couplées à la diffraction des rayons X, comme par exemple celle de HspA du phytopathogène *Xanthomonas axonopodis* subsp. *citri* (code d'accèsion PDB 3GLA) (Hilario *et al.*, 2006; Hilario *et al.*, 2011), de la protéine humaine α -cristalline B (codes d'accèsion PDB 2KLR et 3L1G) (Jehle *et al.*, 2010; Laganowsky *et al.*, 2010) ou encore celle de la protéine bovine α -cristalline A (code d'accèsion PDB 3L1F) (Laganowsky *et al.*, 2010).

De plus, la technique de cryo-microscopie électronique (cryo-EM) couplée à un traitement d'images a permis d'acquérir une reconstruction tridimensionnelle de la structure de nombreuses sHsp comme par

exemple celle de Hsp26 de *S. cerevisiae* (code d'accèsion PDB 2H50) (White *et al.*, 2006) ou de Acr1 de *M. tuberculosis* (code d'accèsion PDB 2BYU) (Kennaway *et al.*, 2005). Le même type de structure montrant des complexes sphériques avec une cavité centrale est souvent obtenu. Cependant, il est important de souligner que le nombre de sous-unités est très variable d'une sHsp à l'autre (Haley *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 2008; Kennaway *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 1998b; Stromer *et al.*, 2003).

II.3.2 L'oligomérisation des sHsp : un processus dynamique

Afin d'obtenir leur structure quaternaire, les sHsp utilisent un processus d'oligomérisation dynamique qui fait intervenir un échange constant et très rapide (de l'ordre des millisecondes) de sous-unités permettant ainsi l'assemblage et le désassemblage des structures de masse moléculaire élevée. Cette plasticité oligomérique est basée sur l'utilisation de particules plus petites qui servent de blocs de construction aux complexes multimériques. Par exemple, pour la formation de sa structure quaternaire de forme triangulaire, la protéine Hsp16.3 de *M. tuberculosis* fait appel à des trimères de trimères (Chang *et al.*, 1996). Cependant, les protéines Hsp16.5 de *M. jannaschii* et Hsp16.9 du blé requièrent l'usage de dimères (Kim *et al.*, 1998a). Actuellement, il apparaît que la plupart des sHsp utilisent une structure dimérique comme unité structurale de base parmi lesquelles nous pouvons citer Hsp25 chez la souris et Hsp26 chez la levure (Dudich *et al.*, 1995; Haslbeck *et al.*, 2005; Laksanalamai & Robb, 2004; Lentze *et al.*, 2004; Narberhaus, 2002).

L'échange de sous-unités se produit entre des oligomères de sHsp identiques ou différentes : on obtient alors des complexes dits homo-oligomériques ou hétéro-oligomériques. En effet, une étude utilisant la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) démontre un échange rapide de sous-unités au sein de la protéine α -cristalline A recombinante (Bova *et al.*, 1997). Horwitz et ses collaborateurs, quant à eux, ont montré que les protéines α -cristallines natives isolées des yeux humains sont composées de sous-unités α -cristallines A et B avec un ratio de 3:1 (Horwitz *et al.*, 1999). Ces sHsp permettent ainsi le maintien de la transparence de l'œil. En effet, en absence de ces sHsp, les protéines agrégées s'accumulent dans les corps d'inclusions ce qui a pour conséquence l'apparition de cataracte (Brady *et al.*, 1997). Souvent cette dynamique d'oligomérisation apparaît être un critère indispensable pour que les sHsp puissent exercer correctement leurs activités (voir partie II.4).

II.3.3 L'influence des conditions physico-chimiques sur l'oligomérisation des sHsp

L'oligomérisation des sHsp est fortement influencée par les conditions physico-chimiques du milieu dans lequel elles se trouvent. Le paramètre qui a le plus d'impact sur la structure des sHsp et qui est également celui qui a été le plus étudié est la température. Prenons pour exemple les protéines α -

cristallines humaines : Bova et ses collaborateurs ont mis en évidence, lorsque la température passe de 37 à 42°C, une augmentation du taux d'échange entre les sous-unités de la protéine α -cristalline A (Bova *et al.*, 1997). De plus, une augmentation de température provoque souvent la dissociation des oligomères de taille importante (Haslbeck *et al.*, 1999; Lentze *et al.*, 2004; Nakamoto & Vigh, 2007). Chez la protéine α -cristalline B, ce réarrangement structural permet à cette sHsp de rentrer dans le noyau des cellules NIH 3T3, qui appartiennent à une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris, où elle a un rôle important dans la régulation de la transcription (Klemenz *et al.*, 1997). En revanche, dans le cas de la protéine Hsp16.3 de *M. tuberculosis* une modification de la température n'a pas d'impact sur la taille des oligomères mais provoque des changements au niveau de la structure oligomérique qui augmentent la flexibilité et l'échange de sous-unités au sein de cette sHsp permettant ainsi une meilleure interaction avec ses substrats (Fu & Chang, 2004).

Une modification du pH de l'environnement est également un stress fréquemment rencontré par les sHsp. Dans ce contexte, Chernik et ses collaborateurs ont mis en évidence, par des techniques de filtration sur gel et d'ultracentrifugation analytique, que lorsque le pH est augmenté de 6 à 7,5, une très forte modification de la structure quaternaire des protéines Hsp24 du poulet et Hsp27 humaine est observée conduisant à la dissociation des oligomères de taille importante (Chernik *et al.*, 2004). En revanche, les variations de pH ne semblent pas avoir d'impact sur les structures secondaire et tertiaire de ces protéines suggérant ainsi qu'une modification du pH affecte principalement les interactions s'établissant entre les monomères de sHsp. Concernant la protéine Hsp25, la méthode de dichroïsme circulaire révèle qu'une variation du pH de 7 à 4,5 induit uniquement des changements locaux sur la structure de cette sHsp (Dudich *et al.*, 1995). Si une diminution plus forte du pH est utilisée, cette protéine de stress subit alors une dénaturation due à l'acidité du milieu.

La concentration des sHsp au sein des cellules peut aussi avoir un impact important sur leur oligomérisation. En effet, il apparaît que la dissociation des oligomères est concentration-dépendante car une dilution du milieu provoque le désassemblage des sHsp de *B. japonicum* comme HspB, HspC et HspF (Lentze *et al.*, 2004) ainsi que celui des complexes formés des sHsp humaines Hsp20 et Hsp27 (Bukach *et al.*, 2009). Il en est de même pour Hsp25 qui est uniquement présente sous forme de dimères à faible concentration (37,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), alors que pour des concentrations plus élevées (0,2 et 1,2 mg.mL^{-1}) cette protéine s'organise en structures tétramériques et hexadécamériques (16 sous-unités) (Ehrnsperger *et al.*, 1999).

De nombreuses modifications post-transcriptionnelles, comme la phosphorylation, la glycosylation ou encore l'acétylation, ont un impact important sur la structure quaternaire des sHsp notamment chez les mammifères. Par exemple, la phosphorylation des résidus sérines est à ce jour la modification la plus étudiée et semble être typiquement spécifique au processus d'oligomérisation des sHsp animales. Dans

la plupart des cas, ce changement post-transcriptionnel est associé avec une diminution de la taille des multimères comme cela a été montré chez les protéines Hsp27 et α -cristalline B (Bruey *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1994).

II.4. Les fonctions cellulaires des sHsp

Afin de comprendre leur mécanisme d'action, les sHsp ont été très largement étudiées, révélant, pour certaines, deux activités très distinctes qui concernent deux substrats très différents qui sont les protéines cellulaires et les lipides membranaires. Cette partie décrira les connaissances actuelles que nous possédons sur chacune de ces activités.

II.4.1 L'activité chaperon : la prise en charge des substrats protéiques par les sHsp

En 1992, Horwitz démontre pour la première fois que les sHsp possèdent une activité de chaperon moléculaire ATP-indépendante (Horwitz, 1992). Depuis, cette activité a été détectée chez de nombreuses sHsp qui sont capables de reconnaître spécifiquement des complexes labiles mal pliés et de former immédiatement une interaction stable avec ces protéines cibles en cours de dénaturation en les séquestrant afin de prévenir leur précipitation (Basha *et al.*, 2011; Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a) (Figure 18).

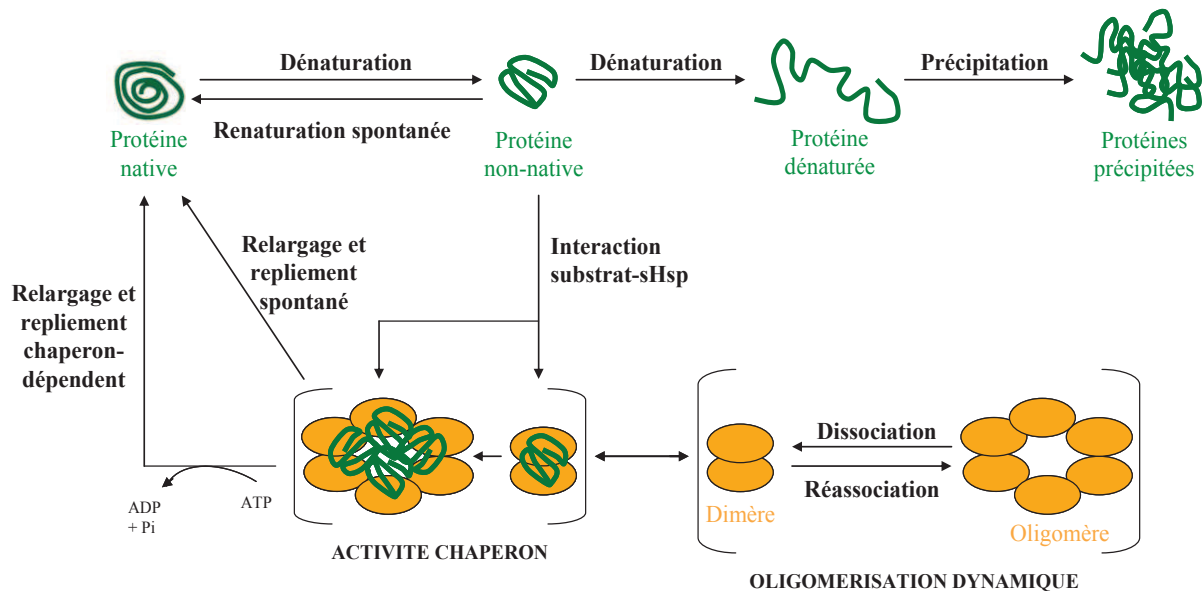


Figure 18 : Mécanisme d'oligomérisation et activité chaperon des sHsp (adapté de Sun et Mac Rae, 2005).

Cependant, le repliement et la libération d'un intermédiaire replié demande de l'énergie, les sHsp sont donc uniquement capables de protéger des substrats protéiques en cours de dénaturation et suppriment ainsi les interactions inappropriées conduisant à la précipitation des agrégats. Afin d'obtenir des chaînes polypeptidiques sous conformation active, il semblerait que les sHsp doivent donc interagir

avec d'autres protéines de stress ATP-dépendante comme le complexe GroESL ou le système DnaK/DnaJ/GrpE. Dans ce contexte d'action simultanée de plusieurs chaperons dans la protection et le repliement de substrats protéiques, il paraît donc difficile de vérifier la contribution individuelle de chaque participant. C'est pourquoi la recherche fait souvent appel à des études *in vitro* plutôt que *in vivo* basées sur la mesure de l'apparition d'agrégats protéiques par suivi d'absorbance ou par centrifugation. Par exemple, de nombreux travaux de diffusion de lumière utilisant des sHsp purifiées montrent que ces protéines sont capables d'agir comme des chaperons moléculaires sans spécificité de substrat particulière car elles sont capables de prévenir l'agrégation de la citrate synthase, de la lactate déshydrogénase, de l'insuline, de la sérine estérase, la luciférase, la malate déshydrogénase... (Basha *et al.*, 2004; Delmas *et al.*, 2001; Eifert *et al.*, 2005; Jaya *et al.*, 2009; Stromer *et al.*, 2003). Ces substrats peuvent être dénaturés thermiquement mais aussi chimiquement *in vitro* comme par exemple lors de l'utilisation du dithiothréitol (DTT) (Abgar *et al.*, 2000; Bukach *et al.*, 2009; Gobbo *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2001). Il est également important de souligner que des études *in vivo* sont également réalisées et indiquent aussi l'action des sHsp sur des substrats très divers. Par exemple, Basha et ses collaborateurs ont réussi à mettre en évidence par immuno-précipitation et chromatographie d'affinité 42 protéines interagissant spécifiquement avec Hsp16.6 de *Synechocystis* lors d'un stress thermique (Basha *et al.*, 2004). Ces substrats ont ensuite été identifiés par spectrométrie de masse et s'avèrent être impliqués dans des fonctions très différentes comme la transcription, la signalisation cellulaire ou encore le métabolisme secondaire.

Actuellement, la façon dont les sHsp se lient aux protéines en cours de dénaturation n'est pas encore vraiment bien comprise. Cependant, il est connu que ces interactions font intervenir des liaisons de type hydrogène, ionique et hydrophobe. De plus, il est généralement bien accepté que l'hydrophobicité de surface des sHsp et de leurs substrats joue un rôle très important. En effet, la dénaturation des protéines cellulaires permet l'exposition de leurs régions hydrophobes qui étaient précédemment enfouies au cœur de leur structure oligomérique. Des interactions hydrophobes peuvent alors s'établir entre les sHsp et les protéines en cours de dénaturation (Reddy *et al.*, 2006). Plusieurs études relatent l'utilisation de sondes fluorescentes comme l'acide 8-anilino-1-naphthalene sulfonique (ANS) ou l'acide 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonique (bis-ANS) afin de pouvoir localiser les sites de liaison aux substrats des sHsp (Sharma *et al.*, 1998a; Sharma *et al.*, 1998b). En effet, il semblerait que ces sondes présentent une hydrophobicité de surface proche de celle des substrats en cours de dénaturation ce qui leur permettrait alors de se fixer sur les mêmes régions au niveau des sHsp.

Il a été proposé que les sHsp sous forme oligomérique seraient une forme de réserve pour les cellules de chaperons moléculaires et que la déstabilisation des oligomères apparaît indispensable pour le bon déroulement de l'activité chaperon des sHsp (Figure 18). En effet, cette modification de structure permet, selon les cas considérés, (i) un réarrangement des sous-unités au sein de l'oligomère, (ii) une

modification de la taille du complexe ou (iii) un changement de conformation au niveau des monomères (Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). La libération des sous-unités provoque une augmentation de l'hydrophobicité de surface qui est indispensable à l'interaction des structures de masse moléculaire faible avec les substrats cellulaires en cours de dénaturation et précède ainsi la réassociation du complexe oligomérique autour du substrat (Bova *et al.*, 1997; Lentze *et al.*, 2004; Sun & MacRae, 2005a). Ce mécanisme en deux temps nécessitant tout d'abord une dissociation de l'oligomère de sHsp puis une réassociation autour des protéines dénaturées a notamment été montré *in vitro* pour Hsp16.3 chez *M. tuberculosis* (Fu & Chang, 2004) et *in vivo* pour Hsp16.6 chez *Synechocystis* (Giese & Vierling, 2002).

II.4.2 L'activité lipochaperon : l'interaction des sHsp avec des substrats lipidiques

Lors de ces dernières années, il a été montré que certaines sHsp sont capables de s'associer avec les membranes. Par exemple, chez la cyanobactérie *Synechococcus vulcanus* PCC 7942, la localisation membranaire de HspA a été mise en évidence par immunocytochimie. Cette méthode a montré une localisation variée de la protéine lorsque cette bactérie est cultivée à 30°C : HspA est retrouvée au niveau des membranes des thylakoïdes, du cytoplasme et dans le carboxysome. En revanche, lors d'un stress thermique de 1 h, la majorité des protéines de HspA sont localisées au niveau des membranes des thylakoïdes afin de pouvoir les stabiliser (Nitta *et al.*, 2005).

L'interaction entre les sHsp et les membranes est réversible et spécifique : les sHsp sont considérées comme des « agents stabilisant les membranes » car elles possèdent la capacité de contrôler leur état physique et leur fluidité mais également de maintenir leur intégrité lors de stress cellulaires (Nakamoto & Vigh, 2007). Les sHsp capables de se lier aux membranes sont des protéines dites amphitropiques car selon leur localisation (qui peut alors être cytoplasmique ou membranaire) elles peuvent fonctionner comme un protecteur des membranes ou comme une protéine chaperon intervenant dans le réseau de contrôle de la qualité des protéines cellulaires (Torok *et al.*, 2001). Notons le cas particulier du chaperon moléculaire GroEL qui, lorsqu'il est lié à des lipides membranaires, conserve sa capacité à replier la malate déshydrogénase préalablement dénaturée thermiquement (Torok *et al.*, 1997). GroEL est alors qualifié par ces auteurs de « lipochaperonine ». A ce jour, cette même capacité n'a encore jamais été démontrée chez les sHsp. Cependant, par extension, le terme activité lipochaperon désigne l'action de stabilisation des membranes par les protéines de stress. Les mécanismes d'interaction entre les sHsp et les membranes seront traités de manière plus approfondie dans le paragraphe III.3.2.b.

II.5. Cas particulier d'une sHsp : la protéine Lo18 de *O. oeni* et la régulation de sa synthèse

La protéine Lo18 a été mise en évidence pour la première fois en 1994 chez la bactérie *Leuconostoc oenos* (devenue par la suite *O. oeni*) lors de stress thermique (42°C) ou acide (pH 3) par un marquage des méthionines des protéines *neo*-synthétisées au ^{35}S suivi d'une séparation électrophorétique des protéines totales et révélation par autoradiographie (Guzzo *et al.*, 1994). Par la suite, la production de cette protéine a été constatée par électrophorèse bidimensionnelle lors d'un stress éthanol 12% (Guzzo *et al.*, 1997) ou encore par immunoblotting en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre Lo18 pour un stress sulfites (60 mg.L⁻¹ de SO₂) (Guzzo *et al.*, 1998) et lors de la phase stationnaire de croissance (Guzzo *et al.*, 1997; Guzzo *et al.*, 2000). Cette protéine de 16 937 Da possède une localisation cytoplasmique mais elle présente également la particularité de pouvoir s'associer de façon périphérique avec la membrane plasmique de *O. oeni* lors de stress environnementaux fluidifiant la bicouche lipidique (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Jobin *et al.*, 1997). Cependant, il est important de noter que la répartition de Lo18 entre ces deux fractions n'est pas équivalente : plus les stress testés ont un impact important sur la fluidité de la membrane, plus la localisation membranaire sera importante. En effet, des travaux d'immunolocalisation de Lo18 au sein de cellules de *O. oeni* (Figure 19), montrent que lors d'un stress thermique à 42°C, Lo18 est répartie de façon équivalente entre le cytoplasme et la membrane cellulaire (panneau B) alors que lors d'un stress thermique plus important (46°C) Lo18 est exclusivement positionnée en association avec la bicouche lipidique (panneau C). Il en est de même pour les panneaux D et E où l'ajout d'agents fluidifiant la membrane (respectivement éthanol 11% et alcool benzylique à 60 mM) a été utilisé. Le panneau A, quant à lui, constitue un contrôle soulignant qu'il n'y a pas ou peu de production de Lo18 lorsque *O. oeni* est cultivée en conditions optimales de croissance.

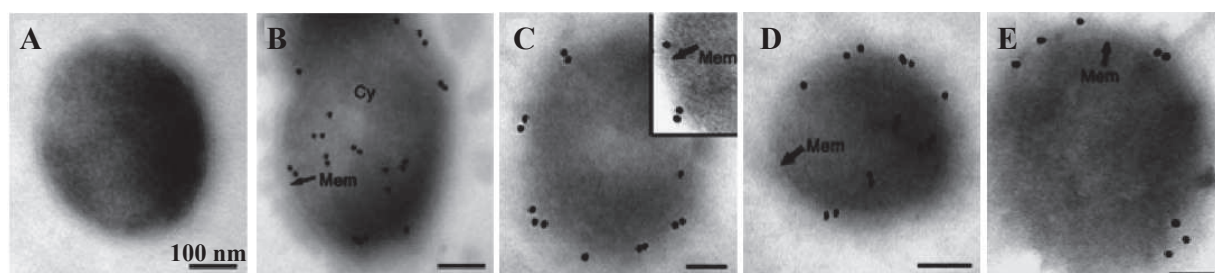


Figure 19 : Immunolocalisation de Lo18 chez *O. oeni* utilisant des anticorps dirigés contre Lo18 et des anticorps secondaires couplés à des particules d'or (d'après Coucheney *et al.*, 2005). (A) *O. oeni* en conditions optimales de croissance (30°C, phase exponentielle de croissance), (B) stress thermique à 42°C, (C) stress thermique à 46°C, (D) stress éthanol 11%, (E) stress alcool benzylique à 60 mM.

Cette double localisation, à la fois cytoplasmique et membranaire, permet à Lo18 d'exercer des activités bien distinctes qui sont d'une part, une activité de chaperon moléculaire ATP-indépendante et

d'autre part une activité de lipochaperon membranaire (Coucheney *et al.*, 2005b; Weidmann *et al.*, 2010). Concernant cette première activité, Delmas et ses collaborateurs ont tout d'abord observé que la protéine Lo18 est capable de limiter l'agrégation thermique *in vitro* de substrats protéiques comme la citrate synthase (45°C) et la lactate déshydrogénase (LDH) (60°C) en absence d'ATP (Delmas *et al.*, 2001). Cependant, contrairement aux systèmes Hsp60 et Hsp70, Lo18 n'est pas capable de réactiver la LDH, laissant ainsi supposer que l'interaction entre Lo18 et d'autres partenaires semble indispensable pour replier la LDH dans une conformation active. Plus récemment, cette activité de chaperon moléculaire a été mise en évidence *in vivo* par Weidmann *et al.* (2010) pour une souche de *E. coli* BL21 star surproduisant Lo18. Dans cette étude, la sHsp est capable de protéger les protéines cellulaires de *E. coli* de la dénaturation thermique. Une activité lipochaperon chez Lo18 a également été démontrée pour la première fois sur des liposomes réalisés à partir de lipides extraits de la membrane de *O. oeni* (Coucheney *et al.*, 2005b). La méthode d'anisotropie de fluorescence utilisant la sonde hydrophobe 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (plus communément appelée sonde DPH) a révélé la capacité de Lo18 à stabiliser la fluidité de ces liposomes à partir de 33,8°C en augmentant l'ordre moléculaire des lipides. Cette technique a également montré que Lo18 est capable de stabiliser la fluidité *in vivo* de la membrane plasmique de *E. coli* (Weidmann *et al.*, 2010). De plus, l'utilisation de la sonde Laurdan, qui permet l'étude des propriétés structurales des phospholipides, indique que l'association de Lo18 avec des vésicules membranaires de *O. oeni* se produit uniquement lorsque les phospholipides sont en phase cristalline (ou désordonnée) (Coucheney *et al.*, 2005b). L'ensemble de ces résultats conforte l'idée que Lo18 participe au maintien de l'intégrité membranaire bactérienne en conditions de stress.

La structure multimérique de Lo18 a également fait l'objet de plusieurs études au sein du laboratoire. Des expériences de cross-linking réalisées *in vitro* et *in vivo* en présence d'agents pontant comme le BS³ ou le formaldéhyde indiquent que Lo18 est capable de s'organiser sous différentes formes oligomériques qui sont les suivantes : un dimère, un trimère et un oligomère de masse moléculaire importante (Delmas *et al.*, 2001; Weidmann *et al.*, 2010). Cependant, ces travaux n'ont pas permis de déterminer quelle(s) forme(s) oligomérique(s) est/sont en interaction avec les substrats qu'ils soient protéiques ou lipidiques.

La protéine Lo18 est codée par un gène d'environ 500 pb nommé *hsp18*. En amont de sa séquence codante, ce gène possède une région promotrice qui contient 2 sites putatifs de fixation du régulateur transcriptionnel CtsR (*Class Three Stress Gene Repressor*). Ce sont des séquences heptanucléotidiques répétées directes en tandem (Figure 20) très bien conservées chez les bactéries à Gram positif où se fixe la protéine CtsR sous forme dimérique grâce à un motif hélice-boucle-hélice contenue dans sa partie N-terminale.

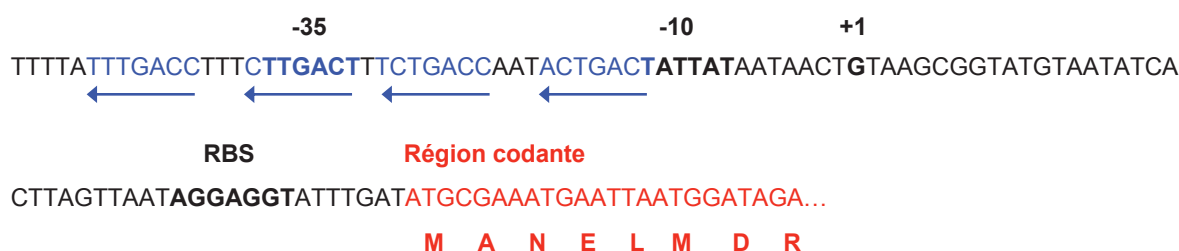


Figure 20 : Organisation de la région promotrice du gène *hsp18* (d'après Grandvalet *et al.*, 2005). Les séquences des régions -10 et -35, le site de fixation du ribosome (RBS) et le site d'initiation de la transcription sont écrits en gras. Les flèches soulignant la séquence nucléotidique de couleur bleue indiquent le site de fixation du répresseur CtsR. En rouge sont indiquées la séquence codante du gène *hsp18* ainsi que la séquence protéique de Lo18 correspondante.

Actuellement, la régulation de l'expression du gène *hsp18* chez *O. oeni* par le répresseur CtsR n'a jamais été clairement démontrée. Cependant, une étude en système hétérologue menée au sein du laboratoire a montré que l'expression du gène *hsp18* ainsi que celle d'autres gènes comme *clpP*, *clpL2*, *ctsR* ou encore *groES* et *grpE* est dérégulée chez un mutant Δ *ctsR* de *B. subtilis* suggérant que l'expression de ces gènes est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel CtsR (Grandvalet *et al.*, 2005). De plus, il semblerait que CtsR soit le régulateur majeur de l'expression des gènes de réponse au stress chez *O. oeni* (Grandvalet *et al.*, 2005). CtsR a particulièrement été étudié chez *B. subtilis* où il régule négativement l'expression des gènes *clpP*, *clpE* et *clpC*. Chez cette bactérie, la protéine CtsR est codée par le gène *ctsR* qui est le premier gène de l'opéron tétracistronique *clpC*, il est suivi de *mcsA* et *mcsB* (qui codent pour des modulateurs de l'activité de CtsR) et de *clpC* (Figure 21).

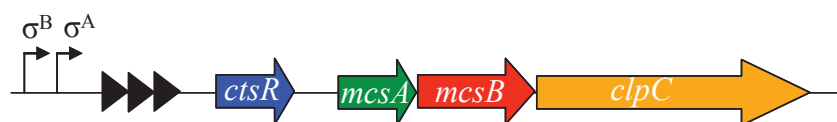


Figure 21 : Structure de l'opéron *clpC* chez *B. subtilis*. Les triangles dans la région promotrice représentent les sites de fixation du répresseur CtsR (d'après Kirstein *et al.*, 2007).

La régulation de l'expression des gènes de stress par CtsR lors de stress environnementaux a été très bien caractérisée par Kirstein et son équipe chez *B. subtilis* (Kirstein *et al.*, 2005; Kirstein *et al.*, 2006; Kirstein *et al.*, 2007; Kirstein *et al.*, 2009). En absence de stress, McsB sous forme non phosphorylée se lie à ClpC qui inhibe alors son activité kinase (Figure 22). Lors d'un stress, la protéine MecA reconnaît les protéines cellulaires agrégées et entre alors en compétition avec McsB pour se lier à ClpC. L'effet antagoniste de MecA associée aux protéines dénaturées permet la libération de McsB. McsA, le co-facteur de McsB, peut alors s'autophosphoryler et activer McsB par phosphorylation afin d'inhiber l'activité de répresseur de CtsR. En effet, la protéine MscB phosphorylée reconnaît spécifiquement CtsR et exerce son activité tyrosine kinase ce qui a pour conséquence de phosphoryler les résidus tyrosines de CtsR (Kirstein *et al.*, 2007). L'interaction entre CtsR et l'ADN est alors inhibée permettant ainsi l'expression des gènes de réponse au stress (Kirstein *et al.*, 2005). CtsR est ensuite piégée par McsB et dégradée par ClpCP (Kirstein *et al.*, 2007). Lors du retour aux conditions

normales de croissance, McsB est déphosphorylée par YwIE, permettant ainsi la reprise de la répression de l'expression des gènes de stress par CtsR (Elsholz *et al.*, 2010).

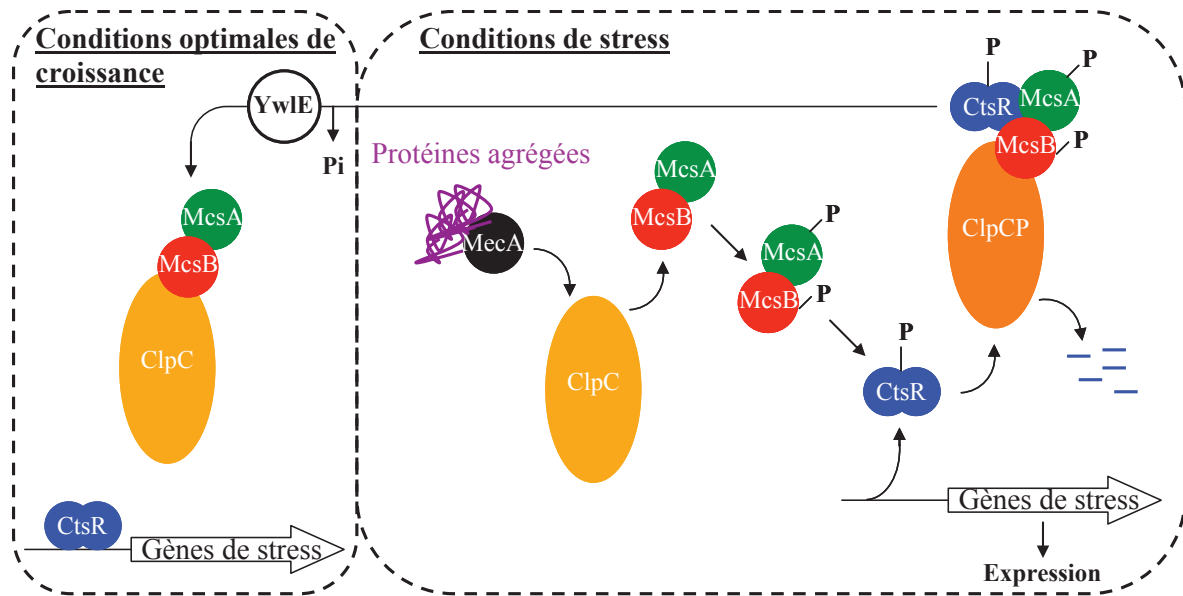


Figure 22 : Modèle de la régulation de l'expression des gènes de stress via le répresseur CtsR chez *B. subtilis* (adapté de Kirstein *et al.*, 2007).

En revanche, les protéines McsA et McsB ne sont pas toujours présentes chez les bactéries à Gram positif contrairement à CtsR et ClpC. Ces bactéries doivent donc faire appel à d'autres mécanismes qui sont plus ou moins identifiés pour dégrader CtsR. Par exemple, aucune région codante pour McsA n'a pu être mise en évidence chez de nombreuses souches de lactobacilles et de streptocoques (Varmanen *et al.*, 2003). Cependant, il apparaît que le domaine en doigt de zinc situé dans la partie N-terminale de ClpE présente une bonne identité avec les 32 premiers acides aminés de McsA chez *B. subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Plusieurs auteurs avancent l'hypothèse que ClpE pourrait alors être un homologue fonctionnel de McsA (Elsholz *et al.*, 2011; Varmanen *et al.*, 2003). De plus, une étude très récente réalisée chez *S. mutans*, un pathogène de la cavité bucale, révèle que chez cette bactérie déficiente pour les gènes *mcsAB*, seule la protéine ClpL (et non ClpC ni ClpP) est impliquée dans la dégradation du régulateur CtsR (Tao *et al.*, 2012).

Concernant la bactérie *O. oeni*, les gènes *clpL1*, *clpL2* et *clpP* ont été identifiés dans son génome. De plus, il a été montré que le gène *ctsR* est organisé en opéron avec *clpC* (Grandvalet *et al.*, 2005). Néanmoins, à ce jour, les mécanismes cellulaires impliqués dans la dégradation du régulateur CtsR chez cette bactérie n'ont pas encore été élucidés.

II.6. Les sHsp et les maladies humaines, leurs applications en biotechnologie

Récemment, des liens importants ont été mis en évidence entre de nombreuses maladies non héréditaires et des anomalies au niveau de la synthèse des sHsp (Clark & Muchowski, 2000; Garrido *et al.*, 2012; Sun & MacRae, 2005b). A titre d'exemples, une altération de la régulation de la synthèse

des sHsp a été montrée pour plusieurs cancers comme celui du cerveau, de la peau ou des tissus conjonctifs. Un mauvais repliement des protéines cellulaires par les sHsp semble également associé à des troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou lors de multiples scléroses (Laskowska *et al.*, 2010). De plus, une ou plusieurs modifications de la séquence primaire des protéines α -cristallines A et B, qui sont nécessaires à la transparence du cristallin, peuvent provoquer des cataractes (Brady *et al.*, 1997). Dans les tissus musculaires, où les sHsp sont très abondantes, des modifications de ces protéines sont responsables de myopathies cardiaques et squelettiques (Basha *et al.*, 2011). Ceci n'est qu'un très bref aperçu des pathologies pouvant être associées à un mauvais fonctionnement des sHsp montrant une fois de plus l'importance des ces protéines au sein des cellules. En revanche, la connaissance des sHsp au sein de microorganismes pathogènes peut parfois contribuer à l'avancée de la médecine. En effet, la présence de la protéine de stress Hsp16.3 comme antigène de surface chez *M. tuberculosis*, a permis très récemment de créer un nouveau vaccin. Les premiers résultats de vaccination obtenus chez la souris semblent très prometteurs et ce vaccin pourrait permettre de contrôler et pourquoi pas d'éradiquer la tuberculose qui reste encore, de nos jours, un problème majeur de santé publique (Niu *et al.*, 2011).

Cette étude, qui montre une application directe de nos connaissances sur les sHsp, nous amène maintenant à nous intéresser à quelques applications biotechnologiques de ces protéines de stress qui ont émergées au cours de ces dernières années. Dans un premier temps, les sHsp ont été employées dans la surproduction de protéines recombinantes bactériennes comme par exemple chez *E. coli*. En effet, la synthèse d'importantes quantités de protéines « étrangères » dans les cellules provoque la formation d'agrégats protéiques insolubles appelés corps d'inclusion. Dans certains cas, cette apparition de vésicules insolubles peut faciliter la récupération des protéines recombinantes car elles sont séparables des autres constituants cellulaires par centrifugation douce et permettent l'obtention de protéines ayant un haut degré de pureté. En revanche, une connaissance poussée des protocoles de re-solubilisation protéique est nécessaire pour obtenir des protéines recombinantes sous forme active. C'est pourquoi, plusieurs études relatent l'utilisation de la co-expression des protéines recombinantes avec des sHsp comme IbpA et IbpB qui auraient pour rôle de protéger les protéines *neo*-synthétisées de l'agrégation et de la dégradation par les protéases cellulaires (Han *et al.*, 2004; LeThanh *et al.*, 2005).

Ensuite, les sHsp peuvent être utilisées dans les technologies utilisant des protéines d'intérêt immobilisées sur des surfaces comme par exemple dans les kits de diagnostic immunologique utilisant la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui font appel à des anticorps qui doivent conserver leur fonctionnalité et leur structure tridimensionnelle. Les sociétés de biotechnologie peuvent alors avoir recours à l'utilisation de la protéine murine Hsp25 qui a pour propriétés de

stabiliser les activités antigénique et enzymatique des protéines (Ehrnsperger *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2008).

Pour terminer, prenons comme dernier exemple, l'usage des sHsp comme additifs dans la production d'aliments. En effet, une utilisation de la protéine Lo18 de *O. oeni* dans la fabrication de gels laitiers fermentés (comme c'est le cas pour les fromages ou les yaourts) a été suggérée. L'ajout de Lo18 a notamment permis de diminuer le temps de gélification d'environ 20% et d'augmenter le phénomène de synérèse dans le produit permettant ainsi l'obtention d'un gel laitier plus ferme aussi bien en terme de texture que de viscosité (Guzzo *et al.*, 2010; Guzzo, 2012; Ronez, 2012). Bien sûr, la liste d'exemples présentée ici est loin d'être exhaustive et laisse entrevoir un large spectre d'applications futures pour les sHsp, que ce soit pour des usages *in vivo* ou bien *in vitro*.

III. Le maintien de l'intégrité membranaire

La membrane cytoplasmique est le point de contact principal des microorganismes avec l'environnement extérieur. Elle est essentielle à la survie des bactéries et assure un nombre de fonctions très importantes. Elle permet notamment la limite mécanique de la cellule, le transport des éléments nutritifs et des déchets, la détection des signaux de l'environnement... Cette barrière perméable sélective est aussi le site de processus métaboliques essentiels comme la respiration, la synthèse des lipides ou encore des constituants de la paroi cellulaire (Voet & Voet, 2005). Le maintien de l'intégrité de la membrane cytoplasmique est donc indispensable à la survie des microorganismes. Dans ce chapitre, la composition, la structure et la dynamique des membranes biologiques seront décrites.

III.1. Les constituants des membranes bactériennes

En 1972, les membranes ont été décrites comme des « mosaïques fluides » par Singer et Nicholson (Singer & Nicholson, 1972) : elles sont un assemblage de deux couches organisées de lipides contenant des protéines partiellement ou complètement enchâssées et de petites quantités de glucides (Figure 23).

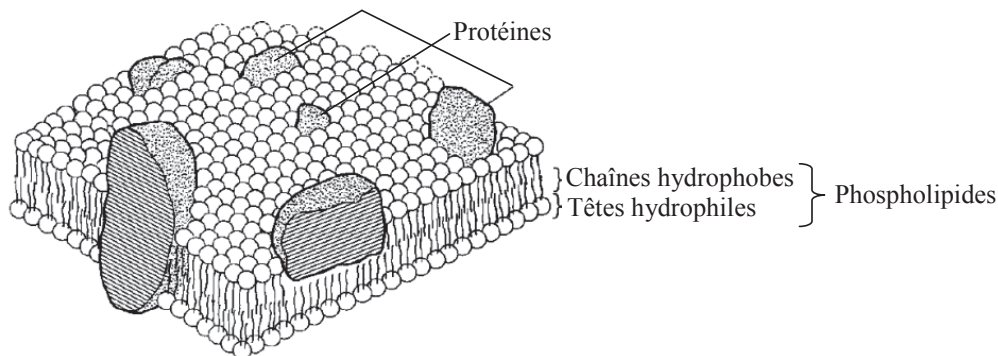


Figure 23 : La structure de la membrane cytoplasmique des procaryotes. Représentation schématique de la « mosaïque fluide » montrant les protéines membranaires insérées dans une bicouche phospholipidique (adapté de Singleton, 2005).

Les lipides de la membrane ont une structure asymétrique contenant une extrémité polaire qui interagit avec l'eau et une extrémité non polaire : ils sont dits amphipathiques. La disposition des molécules de lipides, principalement des phospholipides, est telle que les faces interne et externe de la membrane sont hydrophiles alors que l'intérieur est hydrophobe. La membrane cytoplasmique est une structure très fine qui mesure entre 5 et 10 nm d'épaisseur. Contrairement aux membranes eucaryotes, les membranes bactériennes sont dépourvues de stérols (Prescott *et al.*, 2010).

III.1.1 Les différentes classes de phospholipides

La nature chimique des phospholipides est essentielle pour leur capacité à former des bicouches. Egalement appelés glycérophospholipides, ils sont formés à partir d'une molécule de glycérol-3-phosphate qui est estérifiée par des chaînes hydrocarbonées d'acides gras en position C₁ et C₂ (souvent notées R₁ et R₂). Le 3^{ème} carbone, associé à l'acide phosphorique, est quant à lui estérifié par un substituant, souvent noté -X, qui définit la nature du phospholipide (Voet & Voet, 2005). Les principaux phospholipides retrouvés dans les membranes bactériennes sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I : Les classes courantes de phospholipides (d'après Voet et Voet, 2005).

Nom de -X	Formule de -X	Nom du phospholipide
Eau	-H	Acide phosphatidique
Ethanolamine	-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Phosphatidyléthanolamine (PE)
Choline	-CH ₂ CH ₂ (CH ₃) ₃ ⁺	Phosphatidylcholine (PC ou lécithine)
Sérine	-CH ₂ CH(NH ₃ ⁺)COO ⁻	Phosphatidylsérine (PS)
Inositol		Phosphatidylinositol (PI)
Glycérol	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Phosphatidylglycérol (PG)
Phosphatidylglycérol		Diphosphatidylglycérol (DPG ou cardiolipide)

La composition en phospholipides membranaires varie en fonction des espèces bactériennes mais, dans la plupart des cas, les phospholipides majoritaires sont la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol. Par exemple, chez *O. oeni* DSM 10519 en phase stationnaire, ils représentent respectivement 40 et 18% des phospholipides (Teixeira *et al.*, 2002). Alors que chez *E. coli* K12, ils représentent 72 et 21% des lipides présents dans la membrane interne et 81 et 17% de la membrane externe lorsque cette souche est cultivée en milieu LB à 17°C (Morein *et al.*, 1996).

Les membranes bactériennes sont un système fortement organisé et asymétrique. En effet, dans la plupart des cas, les lipides des deux feuillet de la bicouche ne sont pas distribués de manière homogène. De plus, les molécules lipidiques peuvent se déplacer au sein de la membrane (Figure 24).

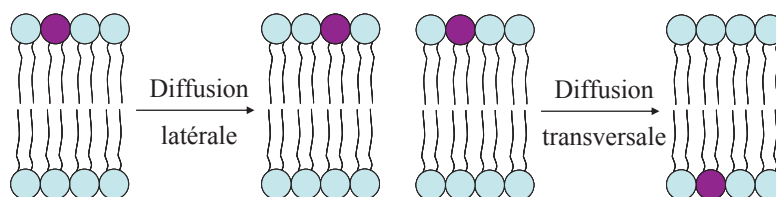


Figure 24 : Déplacements des lipides dans une bicouche lipidique (d'après Voet et Voet, 2005).

La diffusion latérale, très couramment observée, consiste en l'échange de place entre deux molécules de phospholipide voisines au sein d'un même feuillet. La diffusion transversale (ou mouvement flip-flop) ne se produit que très rarement et correspond au transfert d'un lipide d'un feuillet de la bicouche à l'autre. Ce mouvement, rendu possible grâce à l'utilisation d'enzymes appelées flippases, est très coûteux en énergie pour les cellules (Voet & Voet, 2005).

En phase aqueuse, les molécules amphiphiles peuvent s'organiser sous différentes structures qui sont présentées dans la Figure 25.

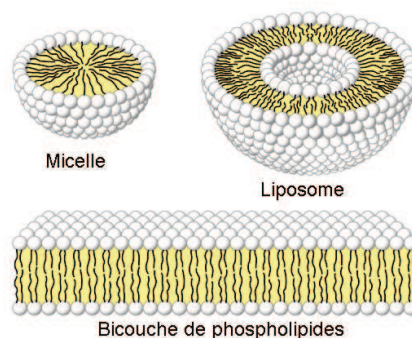
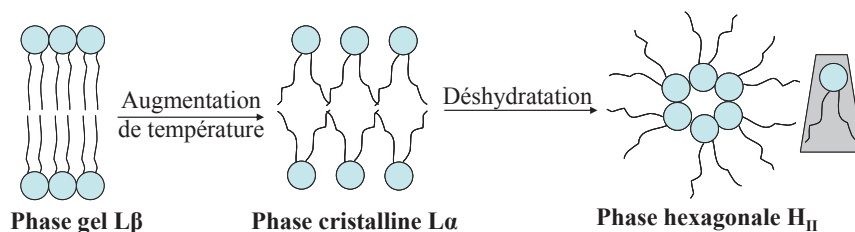


Figure 25 : Structures formées par les molécules amphiphiles en milieu aqueux (http://scd-theses.u-strasbg.fr/2039/01/PERINO_Aurelia_2010.pdf).

La première structure observée est appelée micelle. Ce sont des agrégats globulaires dont les chaînes carbonées sont à l'abri de l'eau. Cette disposition moléculaire élimine les contacts défavorables entre l'eau et les queues hydrophobes des phospholipides en permettant la solvation des groupements polaires (Voet & Voet, 2005). Les phospholipides peuvent également former des liposomes qui sont des vésicules fermées constituées d'une ou plusieurs couches lipidiques et organisées entre deux compartiments aqueux (Bangham *et al.*, 1965; Johnson *et al.*, 1971). Ils sont regroupés en différentes classes : les liposomes multilamellaires (MLV), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV) et les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV). Enfin, la structure dite en bicouche est obtenue lorsque les contraintes stériques conduisent au compactage des lipides en feuillets bimoléculaires. On dit alors que les lipides sont organisés en phase lamellaire $L\beta$ également appelée phase gel : les

phospholipides sont dans une conformation ordonnée où les chaînes d'acides gras sont parallèles les unes par rapport aux autres (Figure 26).

A. Molécules amphiphiles à doubles chaînes carbonées longues



B. Molécules amphiphiles à doubles chaînes carbonées courtes ou à simple chaîne

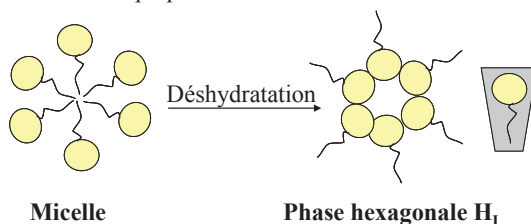


Figure 26 : Organisation des molécules amphiphiles dans une phase lipide-eau (adapté de http://biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Lipids/Micelles_and_Bilayers).

Lorsque les conditions environnementales changent, comme par exemple les conditions d'hydratation ou de température, une transition peut se produire vers un état désordonné appelé phase lamellaire liquide cristalline $L\alpha$ (Figure 26) : les molécules sont alors très mobiles dans le plan de la bicouche. Il existe deux autres états polymorphiques dits hexagonaux. La phase hexagonale H_I est observée lorsque les phospholipides ont une structure dite en cône inversé (c'est le cas pour les lysophospholipides qui ne contiennent qu'une seule chaîne carbonée) alors que la phase hexagonale H_{II} est induite par des phospholipides s'inscrivant dans un cône (comme par exemple la phosphatidyléthanolamine) (Weber & De Bont, 1996). Le passage d'une structure à l'autre est caractérisé par des températures de transition : T_M caractérise la température de passage de la phase gel à la phase liquide cristalline et T_{LH} désigne la température de transition de l'état lamellaire à l'état hexagonal. Ces températures de transition augmentent avec la longueur des chaînes d'acides gras qui composent la bicouche et le passage de la conformation *cis* à *trans* et diminuent en présence d'insaturation(s).

III.1.2 Les acides gras bactériens

Les acides gras bactériens sont des acides carboxyliques contenant des chaînes carbonées dont le nombre de carbones varie généralement entre 12 et 20. Ils peuvent être saturés, monoinsaturés (lorsqu'ils contiennent une seule double liaison), ramifiés ou également contenir un cycle propane (Figure 27).

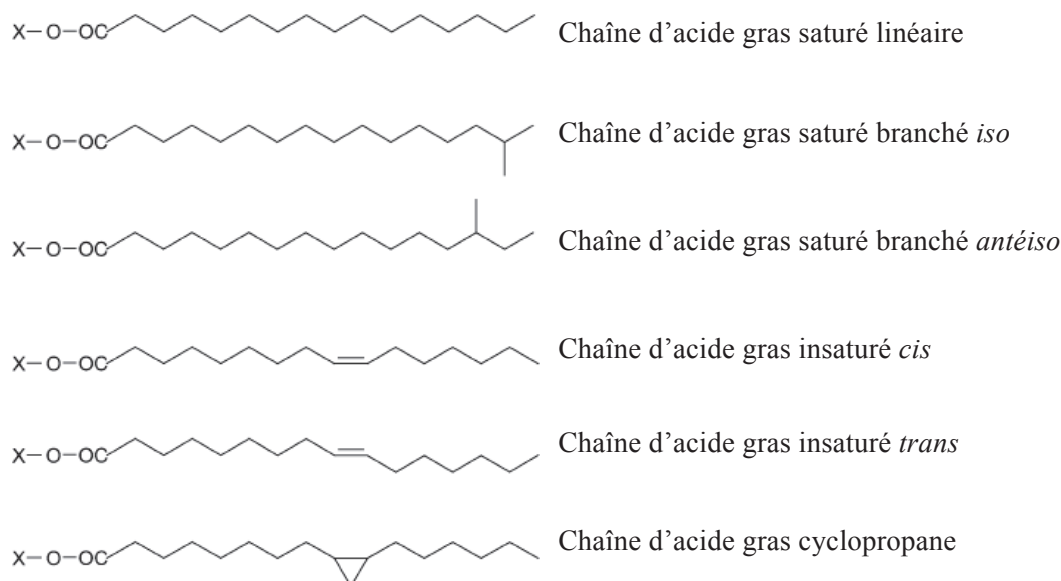
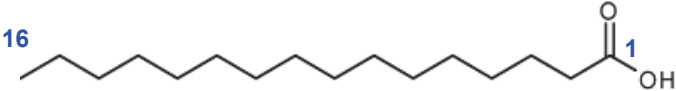
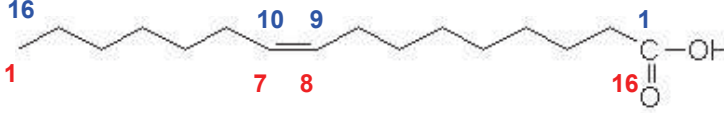


Figure 27 : Les différentes conformations des chaînes d'acides gras (d'après Denich *et al.*, 2003).

Il existe deux types de nomenclatures pour désigner les acides gras. La nomenclature chimique utilise un nom systématique qui décrit leur structure et en particulier leur nombre d'insaturations. Leur nom est formé ainsi : « acide *cis/trans*-z-(radical du nombre de carbone)a/énoïque ». Cette nomenclature indique la conformation de l'insaturation (*cis* ou *trans*), la position de l'insaturation (z), un radical qui dépend du nombre d'atomes de carbone, l'absence ou la présence d'insaturations (-an ou -èn) et le suffixe -oïque indique qu'il s'agit d'un acide carboxylique. La numérotation des carbones est déterminée en comptant à partir du carbone de la fonction carboxylique. Cette nomenclature est souvent abrégée ainsi : « Cx:y n-z » avec x : nombre d'atomes de carbone, y : nombre d'insaturations et z : numéro du carbone portant l'insaturation. Une seconde nomenclature, appelée nomenclature biochimique, est utilisée pour nommer les acides gras. La numérotation des carbones commence alors à partir du groupement méthyle terminal et les acides gras sont notés « Cx:y ω-z ». Un exemple de désignation d'acides gras avec les deux nomenclatures est présenté dans le Tableau II.

Tableau II : Structure chimique et désignations d'un acide gras saturé (l'acide palmitique) et de son acide gras mono-insaturé correspondant (l'acide palmitoléique) selon la nomenclature chimique (bleu) et biochimique (rouge).

Nom courant	Nom selon la nomenclature chimique	Nomenclature chimique	Nomenclature biochimique
Acide palmitique	Acide hexadécanoïque	C16:0	/
			
Acide palmitoléique	Acide 9- <i>cis</i> -hexadécénoïque	C16:1 n-9	C16:1 ω-7
			

Les acides gras les plus couramment retrouvés chez les bactéries sont répertoriés dans le Tableau III.

Tableau III : Les acides gras bactériens usuels (Prescott *et al.*, 2010; Voet & Voet, 2005).

Symbole ^a	Nom courant	Formule chimique semi-développée
Acides gras saturés		
C12:0	Acide laurique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
C14:0	Acide myristique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
C16:0	Acide palmitique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
C18:0	Acide stéarique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
C20:0	Acide arachidonique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Acides gras monoinsaturés (toutes les doubles liaisons sont cis)		
C14:1 <i>n</i> -9	Acide myristoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C16:1 <i>n</i> -9	Acide palmitoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1 <i>n</i> -11	Acide vaccénique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
C18:1 <i>n</i> -9	Acide oléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C20:1 <i>n</i> -9	Acide gadoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Acides gras cyclopropanes		
cyc C19:0 <i>n</i> -9	Acide lactobacillique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{---} \triangle \text{---} (\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
cyc C19:0 <i>n</i> -11	Acide dihydrosterculique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9 \text{---} \triangle \text{---} (\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

^a Nombre d'atomes de carbones : Nombre de double liaison

Pour les acides gras insaturés, dans *n*-x, n est le nombre de double liaison et x désigne la position du premier atome de carbone porteur de la double liaison en comptant à partir de groupement carboxylique.

Pour les acides gras cyclopropanes, x désigne la position du cycle propane.

La composition en acides gras des membranes peut varier lorsque les bactéries sont soumises à un stress. Par exemple, chez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, les acides gras les plus représentés en conditions optimales de croissance dans un milieu M17/7 sont l'acide vaccénique (32%), l'acide palmitique (23%) et l'acide lactobacillique (18%). En revanche, lors de l'ajout de 6% d'éthanol, les principaux acides gras deviennent l'acide lactobacillique (25%), l'acide palmitique (23%) et l'acide palmitoléique (17%) (To *et al.*, 2011). Chez *O. oeni*, la présence de 8% d'éthanol provoque l'augmentation de la proportion des acides gras saturés et cycliques comme l'acide palmitique et l'acide lactobacillique et la diminution du taux d'acide gras insaturés comme les acides palmitoléique et oléique (Grandvalet *et al.*, 2008).

III.1.3 Les protéines membranaires

On distingue deux types de protéines membranaires : les protéines extrinsèques (ou périphériques) et les protéines intrinsèques (ou transmembranaires). Les protéines extrinsèques sont faiblement associées à la membrane cytoplasmique grâce à des interactions électrostatiques faibles (de type Van der Waals ou liaisons hydrogène) qui s'établissent avec les protéines intrinsèques qui émergent de la membrane ou avec les parties polaires des lipides. Elles sont solubles en solution aqueuse et

représentent 20 à 30% des protéines membranaires totales (Singleton, 2005). Environ 70 à 80% des protéines membranaires sont donc intrinsèques. Elles sont associées de façon forte aux parties apolaires des lipides par des interactions hydrophobes. Cependant, elles peuvent être totalement insérées dans la bicouche lipidique ou être localisées d'un seul côté de la membrane. Ces protéines transmembranaires peuvent se déplacer latéralement dans la membrane mais elles ne peuvent pas basculer, ni tourner dans la bicouche (Singleton, 2005). Parmi les nombreuses protéines membranaires retrouvées chez les bactéries, nous pouvons citer pour exemples (i) les H^+ -ATPases qui interviennent dans l'établissement du gradient transmembranaire de protons nécessaire à la synthèse des molécules d'ATP ou à l'expulsion des protons, (ii) les protéines de transport permettant le passage de molécules ou d'ions à travers la membrane cytoplasmique ou (iii) les protéines de transduction du signal qui prennent part, entre autres, à la détection et à la réponse de la cellule aux variations environnementales (comme par exemple les systèmes à deux composants).

III.2. La fluidité membranaire

III.2.1 Définition

La fluidité, contraire de la viscosité, est définie au sens strict du terme comme une résistance à un déplacement dans un milieu homogène. Cependant, les membranes étant des milieux hétérogènes, on considère alors que la fluidité membranaire est le reflet des mouvements des constituants membranaires (lipides et protéines) dans le plan de la bicouche : plus la membrane est fluide, plus le désordre observé est important au sein de la bicouche. Par exemple, la présence d'acides gras insaturés augmente la fluidité membranaire car la présence d'une double liaison permet une liberté de mouvement plus grande (Denich *et al.*, 2003). Expérimentalement, la fluidité est représentée par la mesure d'un paramètre physique pouvant lui être associé. La viscosité des membranes biologiques correspondant à un fonctionnement optimal a été évaluée à $0,1 \text{ N.s.m}^{-2}$.

III.2.2 Les techniques de mesure de la fluidité membranaire

Actuellement, de nombreuses techniques ont été mises au point afin d'estimer la fluidité des membranes bactériennes. On distingue notamment (i) la spectroscopie infrarouge (IR) qui permet de suivre les changements conformationnels des chaînes carbonées des acides gras en mesurant la vibration de leurs groupements méthyles, (ii) la calorimétrie différentielle (DSC pour Differential Scanning Calorimetry) qui mesure la température de transition de phase d'un échantillon, ou encore (iii) la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui distingue les organisations micellaire, hexagonale ou lamellaire. La liste présentée ici n'est pas exhaustive cependant, nous décrirons plus en détail la technique de dépolarisation de fluorescence (ou anisotropie de fluorescence) qui est la méthode la plus couramment utilisée et qui a été employée lors de ce travail de thèse. Cette méthode consiste à exciter,

à l'aide d'une lumière polarisée, une sonde contenue dans une bicouche lipidique puis à mesurer l'intensité de fluorescence de la lumière émise parallèlement et verticalement par rapport à la direction du faisceau incident. Le milieu sera considéré comme fluide si $I_{\text{parallèle}} = I_{\text{perpendiculaire}}$. En revanche, $I_{\text{parallèle}} > I_{\text{perpendiculaire}}$ traduira un milieu visqueux (Figure 28).

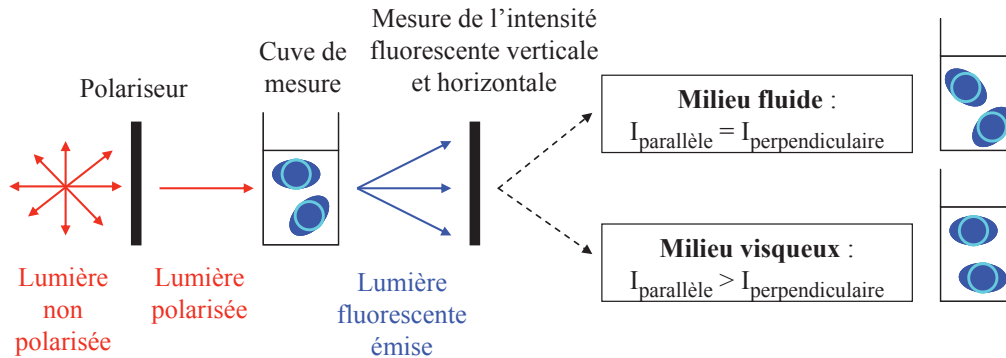


Figure 28 : Schéma représentatif de la technique d'anisotropie de fluorescence (adapté de <http://www.espace sciences.com/BioMb/topo/ndev/cours.htm>).

Le coefficient d'anisotropie de fluorescence (noté r) est ensuite calculé à partir des valeurs de $I_{\text{parallèle}}$ et

$I_{\text{perpendiculaire}}$ à l'aide de la formule suivante :
$$r = \frac{I_{\text{parallèle}} - I_{\text{perpendiculaire}}}{I_{\text{parallèle}} + 2I_{\text{perpendiculaire}}}$$

Une anisotropie de fluorescence faible traduira alors une mobilité accrue de la sonde au sein de la bicouche membranaire donc une fluidité importante pour la bicouche considérée.

Plusieurs sondes fluorescentes peuvent être utilisées afin de mesurer la fluidité des membranes bactériennes (Trevors, 2003). Parmi les plus courantes, on distingue la sonde hydrophobe 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) qui va s'insérer dans la bicouche lipidique au niveau des chaînes d'acides gras et la sonde 1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène (TMA-DPH) qui s'intègre au niveau des têtes polaires des phospholipides. Ces sondes permettent donc respectivement de mesurer les variations de fluidité à l'intérieur ou à la périphérie de la bicouche.

III.2.3 L'impact des conditions environnementales sur la fluidité des membranes

La membrane cytoplasmique est la première barrière protégeant les bactéries contre les changements des paramètres physico-chimiques du milieu. De ce fait, elle est un capteur primordial permettant la détection des modifications des conditions environnementales. L'incorporation de solutés et/ou les variations de l'environnement perturbent les interactions lipide - lipide et lipide - eau des bicouches et par conséquent affecte le fonctionnement de la membrane. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les répercussions des stress couramment rencontrés par les bactéries sur la physiologie de leur membrane cytoplasmique.

III.2.3.a Les variations de température

A ce jour, le stress thermique est l'un des stress le plus étudié chez les bactéries. De manière générale, une augmentation de température favorise la mobilité autour des liaisons carbone-carbone des acides gras se traduisant par une fluidification membranaire allant parfois jusqu'à une transition de l'état gel à l'état liquide (Hazel & Williams, 1990). Il a été démontré sur des membranes modèles constituées de diphosphatidylglycérol (Mandersloot *et al.*, 1981) et des membranes artificielles contenant de la phosphatidyléthanolamine issue d'œufs (Hornby & Cullis, 1981), qu'une température supérieure à 30°C peut induire le passage de ces lipides en phase hexagonale H_{II} . L'agitation thermique peut également provoquer le passage des acides gras en conformation *cis* (désordonnée). De plus, une température élevée provoque l'agrégation des protéines du cytoplasme (Narberhaus, 2002; Vabulas *et al.*, 2010). Une température froide aura alors les effets inverses sur la bicouche lipidique, à savoir, une rigidification de la membrane, une organisation des lipides en phase gel et une conformation *trans* (ordonnée) des acides gras (Shivaji & Prakash, 2010). Il est important de noter que les stress froids n'ont pas seulement des effets sur les membranes biologiques : ils provoquent également une réduction de la transcription et de la traduction, un mauvais repliement des protéines cellulaires et une altération des fonctions ribosomales (Phadtare, 2004).

III.2.3.b La présence d'éthanol

L'éthanol est un alcool aliphatique capable de s'insérer entre les têtes polaires des phospholipides ayant pour conséquence une augmentation de la fluidité membranaire. La présence de cette petite molécule amphiphile dans l'environnement d'accroît la perméabilité membranaire (Dombek & Ingram, 1984) notamment aux protons ce qui peut aboutir à la dissipation de la force proton motrice, l'altération du contrôle du pH interne (Sikkema *et al.*, 1995) voire la fuite des métabolites essentiels à la cellule. Cependant, l'ajout d'éthanol accentue la stabilité membranaire en augmentant la température de transition de l'état lamellaire à l'état hexagonal (T_{LH}) et en diminuant la température de transition pour le passage de la phase gel à la phase liquide cristalline (T_M) (Weber & De Bont, 1996). Pour finir, la présence d'éthanol dans le milieu cellulaire peut provoquer l'inhibition de l'activité des enzymes enchâssées dans la membrane bactérienne et l'agrégation des protéines cytoplasmiques (Almeida *et al.*, 1986). Il est important de noter que les effets observés seront d'autant plus marqués que la longueur de la chaîne carbonée des lipides sera élevée (Gustafson & Tagesson, 1985).

III.2.3.c L'ajout d'alcool benzylique

L'alcool benzylique (BA) est un solvant non polaire utilisé à l'origine comme anesthésique local chez les rats (Gordon *et al.*, 1980). Cependant, ce composé neutre est aussi couramment utilisé en laboratoire afin de fluidifier les membranes (Ashcroft *et al.*, 1977; Coucheney *et al.*, 2005b;

Friedlander *et al.*, 1987). En effet, cette molécule a la capacité de pénétrer dans les bicouches lipidiques : sa partie aromatique s'insère dans la région hydrophobe de la membrane alors que son groupement hydroxyle est retrouvée dans la région polaire. La présence de BA peut aussi affecter l'activité d'enzymes membranaires (Gordon *et al.*, 1980). En revanche, ce solvant ne semble pas avoir d'effet sur les protéines cytoplasmiques.

III.2.3.d La présence d'ions divalents

La présence de cations divalents (comme le Ca^{2+} , le Mg^{2+} ou le Sr^{2+}) peut induire, chez certains lipides, la formation de la phase hexagonale inversée H_{II} . En particulier, les ions Ca^{2+} permettent de diminuer les répulsions électrostatiques entre les têtes polaires des phospholipides chargés négativement et ainsi stabiliser les membranes (Denich *et al.*, 2003). Ces ions peuvent aussi permettre de prolonger les conditions où les bactéries peuvent survivre. Par exemple, la présence de calcium dans le milieu de culture de la bactérie *Bacillus stearotherophilus* permet d'augmenter sa température de croissance de 3°C (Donato *et al.*, 1997).

III.2.3.e Les modifications de pH

En ce qui concerne le pH, peu d'études s'intéressent à son influence sur la fluidité des membranes bactériennes. Cependant, Chu-Ky et ses collaborateurs ont montré par anisotropie de fluorescence, qu'à 30°C une baisse du pH de 4 à 3 provoque une rigidification de la membrane cytoplasmique de *O. oeni* (Chu-Ky *et al.*, 2005). De plus, la valeur du pH extracellulaire a un impact direct sur la charge des phospholipides des membranes bactériennes. Par exemple, à pH 7, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine ont une charge globale neutre alors que la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol et le diphosphatidylglycérol sont chargés négativement. Un changement de pH peut alors modifier les interactions au sein de la bicouche ou même de la bactérie avec son environnement. L'acidité peut également altérer les protéines en modifiant leurs interactions ioniques, ce qui peut causer leur dénaturation voire leur agrégation (Cotter & Hill, 2003).

III.3. La régulation de la fluidité membranaire par les bactéries

La survie des bactéries dépend de leur aptitude à conserver leur fluidité membranaire dans un état optimal et à maintenir la stabilité de leur bicouche lipidique. Généralement, les facteurs qui fluidifient la membrane entraînent des changements de composition au niveau lipidique et protéique permettant de rigidifier la membrane (et inversement).

III.3.1 Les modifications de la composition en lipides membranaires

Des changements plus ou moins rapides (parfois pouvant mettre jusqu'à plusieurs jours) sont mis en place par les bactéries pour maintenir leur fluidité membranaire. Elles peuvent notamment moduler

leur lipidome en synthétisant de nouveaux acides gras, en modifiant la longueur de leurs chaînes carbonées, en changeant le degré et/ou le type d'insaturation, en insérant des cycles propanes ou en modifiant les têtes polaires des phospholipides membranaires (Cronan, 2002). Ces modifications réalisées au niveau des lipides membranaires sont regroupées sous le terme « adaptation homéovisqueuse » (Weber & De Bont, 1996).

III.3.1.a La synthèse d'acides gras chez les bactéries

La synthèse des acides gras *de novo* (ou Fab pour Fatty acid biosynthesis) utilise des systèmes regroupés en deux classes dites de type I et type II (Chan & Vogel, 2010). Chez les bactéries à Gram positif, uniquement celle de type II est utilisée. Le précurseur essentiel de la synthèse des acides gras est l'acétyl-CoA. Dans un premier temps, il est carboxylé par une enzyme appelée acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour obtenir le malonyl-CoA : c'est l'étape d'initiation ou d'activation (Figure 29).

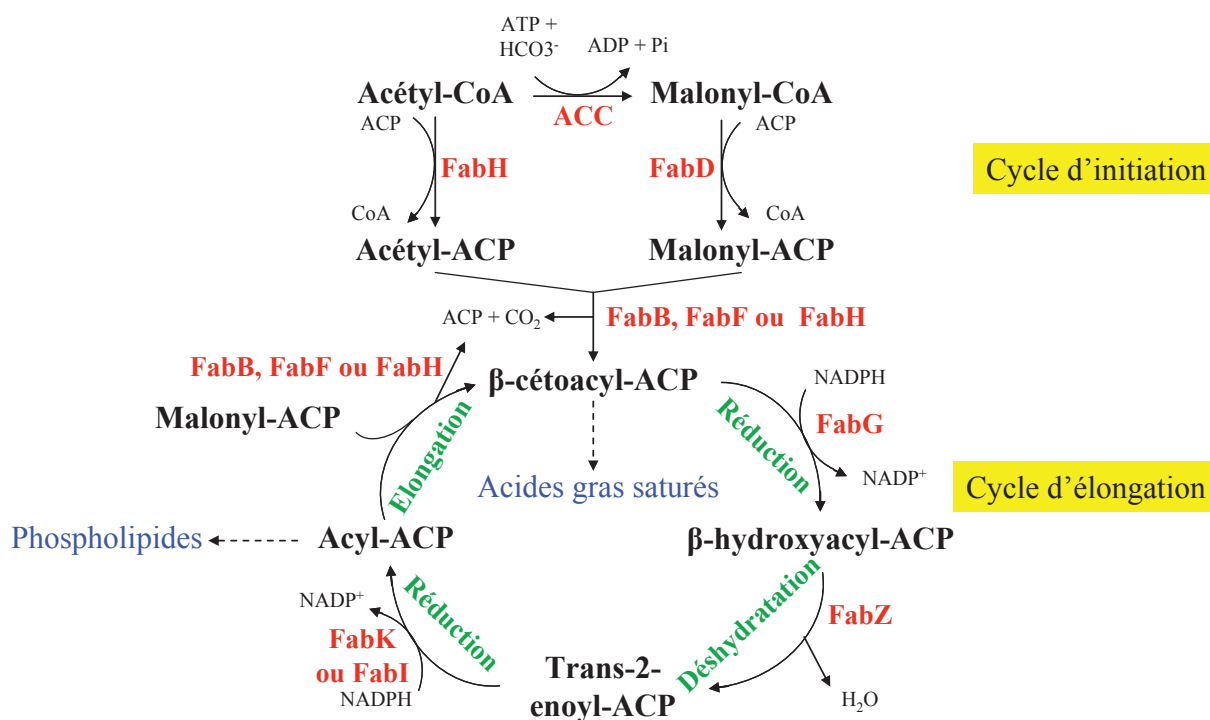


Figure 29 : Initiation de la synthèse et cycle d'élongation des acides gras.

L'ACC est constituée de quatre sous-unités séparées qui sont la biotine carboxylase, produit du gène *accC*, la protéine de transport de biotine-carboxyle (ou ACP pour acyl-carrier protein) issue du gène *accB* et 2 sous-unités nécessaires à l'étape de transfert du groupement carboxyle qui sont codées par les gènes *accA* et *accD*. L'acétyl-CoA est ensuite converti en acétyl-ACP grâce à l'acétyl-CoA : ACP transacylase (codée par *fabH*) et le malonyl-CoA est parallèlement converti en malonyl-ACP par la malonyl-CoA : ACP transacylase (produit du gène *fabD*). Ensuite a lieu le cycle d'élongation des acides gras bactériens (Figure 29). La première étape consiste en la condensation d'une molécule

acétyl-ACP (2 carbones) et de malonyl-ACP (2 carbones) pour donner une molécule de β -cétol-ACP à 4 carbones. Cette réaction est réalisée par une β -cétol-ACP synthase (ou KAS) comme FabB (KASI), FabF (KASII) ou FabH (KASIII). Cette étape est la seule à être irréversible lors du cycle d'élargissement. Le β -cétol-ester obtenu est ensuite réduit par FabG qui est une β -cétol-ACP réductase NADPH-dépendante puis déshydraté par une β -hydroxyacyl-ACP déshydratase appelée FabZ. La réduction finale est catalysée par une ϵ noyl-ACP-réductase (FabK ou FabI) pour former un nouvel acyl-ACP qui sert de substrat pour un autre cycle d'élargissement (Magnuson *et al.*, 1993).

Les systèmes FabI et II permettant la synthèse *de novo* des acides gras sont différents du point de vue enzymologique mais aboutissent tout de même à un spectre identique d'acides gras saturés et insaturés. Il a été montré que la synthèse des acides gras insaturés chez *E. coli* requiert l'utilisation du système FabI qui emploie deux enzymes codées par les gènes *fabA* et *fabB* (Rock & Cronan, 1996) alors que *S. pneumoniae* utilise le système FabII qui utilise un seul gène nommé *fabM* et qui est déficient pour les gènes *fabA* et *fabB* (Lu & Rock, 2006). De plus, chez ces deux microorganismes, l'étape d'insaturation des acides gras n'a pas lieu au même moment de la biosynthèse. Chez *E. coli*, le point de branchement entre la voie des acides gras saturés et celle des insaturés a lieu plus tôt que chez *S. pneumoniae* (au cours de l'étape de déshydratation vs l'étape de réduction). De plus, pour l'élaboration des acides gras saturés *E. coli* fait appel à FabI alors que *S. pneumoniae* utilise FabK (Fujita *et al.*, 2007; Marrakchi *et al.*, 2002). La Figure 30 représente les systèmes Fab utilisés chez ces deux bactéries.

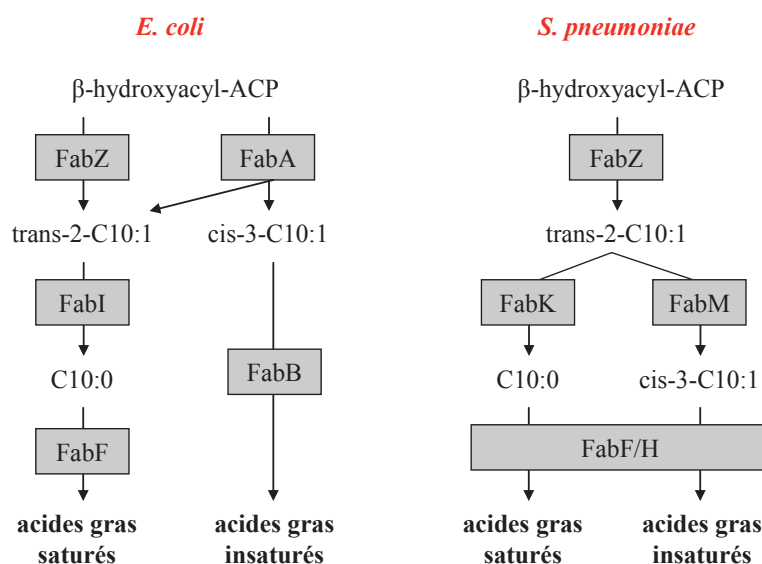


Figure 30 : Comparaison de la voie de biosynthèse des acides gras saturés et insaturés chez *E. coli* et *S. pneumoniae* (d'après Marrakchi *et al.*, 2002).

Chacune des étapes de la biosynthèse des acides gras est réalisée par des enzymes codées par un même cluster appelé *fab*. Une représentation de ce cluster chez *S. pneumoniae* est présentée en Figure 31.



Figure 31 : Organisation du cluster *fab* chez *S. pneumoniae* (Lu & Rock, 2006).

La régulation de l'expression de ce cluster contenant 13 gènes est réalisée par le répresseur transcriptionnel FabT qui appartient à la superfamille des régulateurs de type MarR. Ce répresseur est retrouvé sous forme dimérique en solution et est capable de se fixer sur des séquences palindromiques situées dans la région promotrice des gènes *fabT* et *fabK* afin de réguler l'expression des gènes du cluster *fab* dans son intégralité (Lu & Rock, 2006). Ce type de régulation est décrit entre autres chez les bactéries du genre *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*. Cependant, il est important de noter que les bactéries à Gram positif comme *Bacillus*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* contrôlent l'expression des gènes *fab* à l'aide d'un autre régulateur nommé FapR. Toutefois, il semblerait que l'utilisation de FapR se limite, dans la plupart des cas, aux bactéries pathogènes (Zhang & Rock, 2009).

III.3.1.b Les changements de longueur des chaînes d'acides gras

L'adaptation de la fluidité membranaire aux conditions environnementales peut faire intervenir une modification de la longueur des chaînes carbonées des acides gras. Pour ce faire, les bactéries doivent être obligatoirement en croissance et capables de synthétiser leurs lipides dans ces conditions perturbées (Denich *et al.*, 2003). En effet, après la synthèse des acides gras, la longueur de la chaîne reste fixe. Couramment, en réponse à un stress thermique, une augmentation de la longueur des chaînes carbonées des acides gras est observée (Denich *et al.*, 2003) en particulier car les lipides à longues chaînes ont un point de fusion élevé.

III.3.1.c L'insaturation des acides gras

Le changement du ratio acides gras saturés / insaturés est le mécanisme le plus couramment utilisé par les bactéries pour moduler la fluidité membranaire en réponse à de multiples stress (Denich *et al.*, 2003). Par exemple, de nombreuses études mettent en évidence l'activation de gènes *des* codant pour des désaturases lorsque *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* ou encore la cyanobactérie *Synechocystis* sont soumises à un stress froid (Shivaji & Prakash, 2010; Vigh *et al.*, 1993). Chez *B. subtilis*, l'expression du gène *desA* est régulée par le régulateur DesR qui appartient à un système à deux composants dont la protéine senseur DesK est une histidine kinase capable de détecter les variations de fluidité membranaire (Mansilla & de Mendoza, 2005). En revanche, pour la réponse au stress éthanol, 2 types d'adaptation sont possibles. La première montre une augmentation du taux d'acides gras insaturés pour contrecarrer les effets de l'éthanol sur la structure de la bicouche. Ce mécanisme a notamment été décrit chez plusieurs souches de *Lactobacillus* (Uchida, 1975). Buttke et ses collaborateurs ont, quant

à eux, mis en évidence une inhibition des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras saturés chez *E. coli* (Buttke & Ingram, 1980). La deuxième stratégie mise en place par les bactéries pour contrecarrer les effets de l'éthanol consiste à augmenter l'incorporation de lipides rigides contenant des acides gras cycliques ou saturés pour compenser l'augmentation de fluidité. Ce dispositif a été notamment étudié chez *Clostridium acetobutylicum* où la présence de 20% d'éthanol provoque la synthèse des acides lactobacillique et palmitique (Lepage *et al.*, 1987).

III.3.1.d La transformation des acides gras *cis* en acides gras *trans*

La conversion d'un acide gras insaturé en conformation *cis* à une conformation *trans* se produit uniquement lorsque la croissance bactérienne est arrêtée. Le passage d'une forme à l'autre est catalysé par des isomérases. Cette modification post-synthétique est notamment observée chez *Pseudomonas putida* pour répondre à un stress phénol (Diefenbach *et al.*, 1992). Les acides gras *trans* possèdent 2 avantages comparés à leur isomère *cis* afin de réguler la fluidité des membranes bactériennes : (i) leur T_M est plus élevé ce qui a pour conséquence d'augmenter l'ordre moléculaire des chaînes d'acides gras, et (ii) de par leur conformation, ils occupent moins d'espace dans les membranes bactériennes (Denich *et al.*, 2003).

III.3.1.e La cyclopropanation des acides gras insaturés

Les acides gras cyclopropanes (CFA pour Cyclopropane Fatty Acids) sont produits par modification post-synthétique des acides gras insaturés en conformation *cis* grâce à une enzyme cyclase qui catalyse l'ajout d'un groupement méthylé de S-adenosyl-L-méthionine (SAM) à la double liaison carbone – carbone (Grogan & Cronan Jr, 1997)

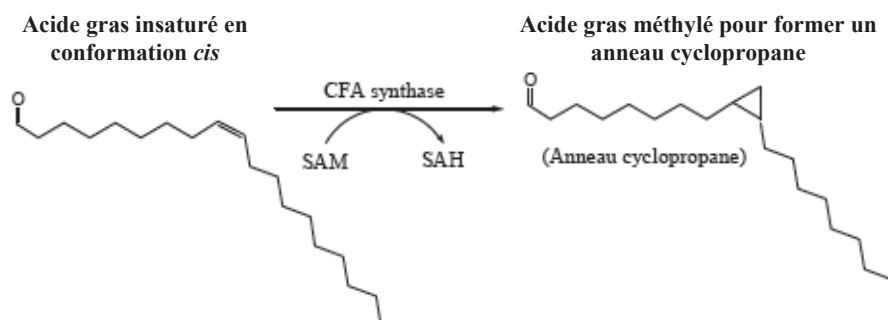


Figure 32 : Cyclopropanation d'un acide gras par l'enzyme CFA synthase.

Cette modification de la structure des acides gras a lieu lors de nombreux stress mais est principalement observée lors de stress acides comme par exemple chez *Clostridium acetobutylicum* (Lepage *et al.*, 1987) ou chez *O. oeni* (Grandvalet *et al.*, 2008). Il a également été montré que des mutants de *E. coli* n'ayant pas de CFA synthase ont un taux de mortalité très important comparé à la souche sauvage lorsque le pH passe brutalement de 7 à 3 (Chang & Cronan, 1999).

III.3.1.f La modification des têtes polaires des phospholipides

Pour maintenir dans un état optimal leur fluidité membranaire, les bactéries ont souvent recours à des changements au niveau des têtes polaires de leurs phospholipides. Ces changements ont notamment des effets importants sur les températures de transition de phase des lipides (T_M et T_{LH}). En effet, pour rester viable, chaque microorganisme possède sa propre balance entre lipides sous forme bicouche et phase hexagonale. Les phases non lamellaires confèrent un avantage pour certaines fonctions membranaires comme la division cellulaire, la fusion membranaire et les mouvements des lipides et des protéines au sein de la bicouche (Weber & De Bont, 1996). De plus, la régulation de la composition en têtes polaires des phospholipides permet de modifier la charge de surface de la bicouche lipidique. Les études de Clark et ses collaborateurs vont dans ce sens en montrant que des mutants de *E. coli* résistants à l'éthanol ont une composition membranaire enrichie en phospholipides anioniques (phosphatidylglycérol et diphosphatidylglycérol) et en phospholipides zwitterioniques (phosphatidyléthanolamine) (Clark & Beard, 1979). Un changement des têtes polaires des lipides est aussi observé lors d'un stress froid chez *Bacillus caldothermex* (Hasegawa *et al.*, 1980).

III.3.2 L'influence des protéines de stress sur la fluidité membranaire

Les lipides ne sont pas les seules molécules pouvant moduler la fluidité membranaire des bactéries. En effet, l'association entre des protéines dites de stress thermique et les membranes peut également constituer un mécanisme général permettant aux cellules de préserver leur intégrité membranaire.

III.3.2.a Les chaperons moléculaires universels (Hsp)

Plusieurs travaux ont montré que les protéines de stress thermique ont la capacité de s'associer et de moduler la fluidité des membranes cellulaires. En particulier chez les eucaryotes, Hsp70 (DnaK chez *E. coli*) est capable d'interagir spécifiquement avec la phosphatidylsérine ou avec des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides (Arispe *et al.*, 2004; Triantafilou *et al.*, 2002). A ce jour, concernant les procaryotes, une seule étude a été réalisée sur la relation entre DnaK et les membranes des thylakoïdes chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. Le génome de cette cyanobactérie révèle la présence de trois gènes putatifs codant pour DnaK mais un seul est transcrit suite à un stress thermique : il s'agit du gène *dnaK2*. Si ce gène est délété partiellement, une diminution de l'inductibilité de chaperons membranaires comme GroEL et Hsp17 est observée tant au niveau du taux de transcrits qu'au niveau de la synthèse protéique (Varvasovszki *et al.*, 2003). De plus, des résultats récents montrent que le produit du gène *dnaK2* est retrouvé en association avec les membranes des thylakoïdes (Horvath *et al.*, 2012). Cependant, les interactions s'établissant entre DnaK et les membranes cellulaires ainsi que son mode action au niveau membranaire restent encore à élucider.

La Hsp GroEL (ou Hsp60 chez les eucaryotes) est grandement conservée chez les microorganismes et est souvent retrouvée en association avec les membranes cytoplasmiques, comme par exemple chez *Mycobacterium leprae*, *E. coli* ou *Borrelia burgdorferi* (Gillis *et al.*, 1985; Newman & Crooke, 2000; Scopio *et al.*, 1994), ou avec les membranes des thylakoïdes comme chez *Synechocystis* ou *Vigna sinensis* (Kovacs *et al.*, 2001; Krishnasamy *et al.*, 1988). De plus, la protéine GroEL est également reconnue comme étant un antigène présent dans l'enveloppe cellulaire de certaines bactéries comme *Legionella pneumophila* et *Klebsiella pneumoniae* (Blander & Horwitz, 1993; Cancino-Diaz *et al.*, 1998). L'analyse du génome de *Synechocystis* révèle l'existence de 2 gènes *groEL* chez cette cyanobactérie. Le premier est organisé en un opéron nommé *groESL*. Le second, appelé *cpn60*, ne contient pas de gène codant pour la protéine co-chaperon GroES à proximité (Glatz *et al.*, 1999). Suite à une exposition à la chaleur ou à la lumière de *Synechocystis*, la protéine GroEL est capable de s'associer avec les membranes des thylakoïdes. Torok et ses collaborateurs ont montré, à l'aide de membranes modèles constituées de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) et de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), qu'un oligomère de GroEL d'environ 14 sous-unités est capable d'interagir avec les lipides uniquement s'ils se trouvent dans un état fluide (phase cristalline) (Torok *et al.*, 1997). De plus, si le pH est abaissé à 4, l'association de GroEL avec la membrane est augmentée. Les auteurs suggèrent que la baisse de pH permettrait l'exposition des régions hydrophobes de la protéine qui serait alors favorable à l'interaction membranaire (Torok *et al.*, 1997). La présence de cette Hsp à la membrane permet une augmentation de l'ordre moléculaire de la bicouche et réduit la tendance naturelle des lipides à entrer en conformation hexagonale.

III.3.2.b Les protéines de stress de faible masse moléculaire (sHsp)

Dans la littérature, certaines sHsp sont décrites comme ayant une localisation membranaire suite à un stress que ce soit chez les mammifères comme pour Hsp22 (Chowdary *et al.*, 2007) ou encore chez les procaryotes avec Hsp16.3 de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2005) ou Hsp18.55 de *Lactobacillus plantarum* (Capozzi *et al.*, 2011). Au laboratoire, un immunomarquage a permis d'étudier le profil de distribution de la protéine de stress Lo18 au sein de cellules de *O. oeni* suite à des stress fluidifiant la membrane (stress thermique, ajout d'éthanol et d'alcool benzylique). Coucheney et ses collaborateurs ont alors montré une localisation de cette sHsp majoritairement membranaire (Coucheney *et al.*, 2005b). De plus, la technique d'anisotropie de fluorescence a permis de montrer que la protéine Lo18 est capable de moduler la fluidité de liposomes en augmentant l'ordre moléculaire de la bicouche lipidique lorsque la température est supérieure à 33,8°C. Dans le même sens, des expériences chez *E. coli* ont mis en évidence un lien entre intégrité membranaire et la présence de sHsp. En effet, des mutants $\Delta ibpAB$ dépourvus des sHsp IbpA et IbpB présentent des altérations de perméabilité et de fluidité membranaires comparés aux cellules contrôles lors de stress thermiques sévères (48-55°C) (Nakamoto & Vigh, 2007).

Actuellement, de nombreuses études montrent l'importance de certains microdomaines lipidiques membranaires, appelés rafts. Ils permettraient, d'une part, la détection ainsi que la signalisation des stress environnementaux aux cellules (Vigh *et al.*, 2005; Vigh *et al.*, 2007b), et d'autre part, l'interaction des sHsp avec certains lipides afin de réguler la fluidité des membranes bactériennes. Dans ce sens, les travaux de Tsvetkova et ses collaborateurs montrent une interaction spécifique entre la protéine humaine α -cristalline B et certains lipides membranaires (dont le dimyristoyl-phosphatidylsérine et le diélaïdoyl phosphatidyléthanolamine) qui pourrait alors confiner la localisation de la sHsp α -cristalline B à certains domaines lipidiques membranaires (Tsvetkova *et al.*, 2002).

A ce jour, la protéine Hsp16.6 ou Hsp17 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 est la sHsp membranaire la mieux documentée : de nombreuses études lui ont été consacrées. Elles mettent notamment en évidence sa capacité à s'associer avec les membranes thylakoïdiennes lors de stress dans le but de contrôler leur état physique, de stabiliser la bicouche et de maintenir l'intégrité membranaire (Horvath *et al.*, 1998; Tsvetkova *et al.*, 2002). En effet, Hsp17 limite l'hyperfluidification et prévient la formation de phase lipidique non lamellaire en stabilisant la phase liquide cristalline au détriment de la phase H_{II} (Horvath *et al.*, 2008). Cette protéine est codée par le gène *hsp17* dont la transcription est fortement corrélée avec l'état de fluidité des membranes des thylakoïdes : les stress fluidifiant la membrane (comme par exemple l'augmentation de la température ou l'ajout de 30 mM d'alcool benzylique) provoque l'expression de ce gène qui a alors été qualifié de « *fluidity gene* » (Horvath *et al.*, 1998). Très récemment, Horvath et Vigh ont proposé un modèle concernant la réponse au stress thermique chez *Synechocystis* (Horvath *et al.*, 2012; Vigh *et al.*, 2007a) (voir Figure 33).

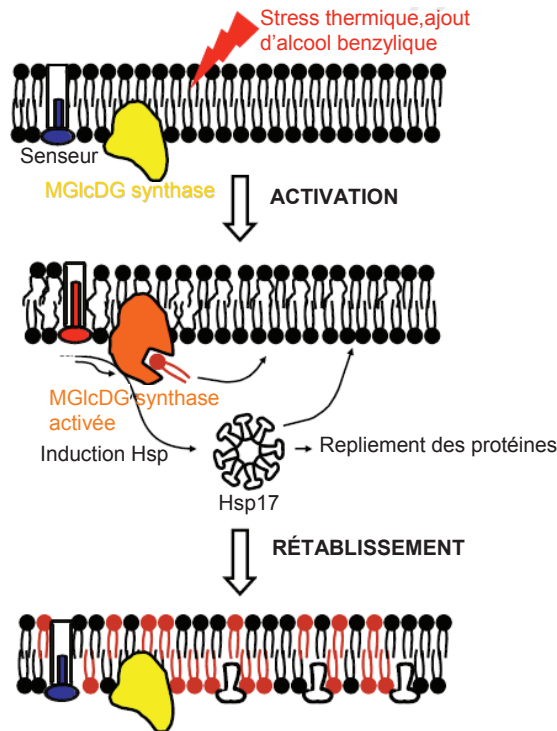


Figure 33 : Modèle de régulation de la fluidité membranaire chez *Synechocystis* suite à un stress fluidifiant la membrane (d'après Horvath *et al.*, 2012). Suite à une augmentation de fluidité, la protéine Hsp17 est synthétisée et la MGLcDG synthase est activée afin d'ajuster la fluidité membranaire.

D'après ce modèle, la membrane est décrite comme jouant le rôle de *thermomètre cellulaire* lorsque la température modifie l'état physique des lipides de la bicouche. Les modifications membranaires engendrées servent alors de signal déclenchant ainsi l'expression des gènes de réponse au stress *via* des mécanismes de transduction du signal. Les Hsp produites ayant une affinité pour la membrane (comme GroELS et Hsp17) vont ensuite se localiser au niveau de domaines membranaires spécifiques afin de réguler la fluidité de la bicouche. C'est notamment le cas pour Hsp17 qui s'associe de façon préférentielle avec un *lipide de choc thermique* hautement saturé, le monoglucosyldiacylglycérol (MGLcDG). Ce glycolipide neutre, le plus abondant des lipides des membranes de *Synechocystis*, est très rapidement formé durant les stress thermique et lumineux grâce à une MGLcDG synthase qui est activée lors du changement de la fluidité membranaire (Balogi *et al.*, 2005; Shimojima *et al.*, 2009). Ici, le stress thermique permettrait la dissociation de Hsp17 afin d'exposer ses régions hydrophobes précédemment cachées au sein de sa structure oligomérique dans le but de favoriser son interaction avec la membrane. De plus, il semblerait que cette protéine pénètre dans le centre de la bicouche pour exercer son activité (Torok *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002). Les auteurs suggèrent également que l'association des Hsp GroESL et Hsp17 avec les membranes, engendrant une augmentation de l'ordre moléculaire de la bicouche, pourraient alors réguler négativement l'expression des gènes de stress (Tsvetkova *et al.*, 2002; Vigh *et al.*, 2007a).

Actuellement, l'oligomérisation des sHsp associées avec la membrane reste obscure. Cependant, plusieurs études relatent la nécessité d'une réorganisation spatiale des protéines de stress. En effet, il s'avère que la protéine humaine Hsp22 est soumise à des changements conformationnels afin de pouvoir se lier à la membrane plasmique des cellules (Chowdary *et al.*, 2007). Ces modifications de structure en vue d'une liaison membranaire ont également été décrites pour Hsp16.3 de *M. tuberculosis* : cette sHsp s'organise *in vitro* sous forme de nonamères et Zhang et ses collaborateurs ont démontré que la dissociation de ces oligomères est un pré-requis pour le processus d'attachement à la bicouche (Zhang *et al.*, 2005). Plus particulièrement, il semblerait que les nonamères se dissocient en monomères puis se réorganisent ensuite en dimères pour interagir avec la membrane comme le montre la structure cristalline et les expériences de cross-linking de cette protéine obtenue en présence de lipides chargés positivement par Chen et son équipe (Chen *et al.*, 2003). Il en est de même pour Hsp17 qui nécessite la dissociation de sa structure oligomérique en dimères pour pouvoir interagir avec des liposomes formés de lipides extraits des membranes thylakoïdiennes de *Synechocystis* (Balogi *et al.*, 2008). A ce jour, ces études sont les seules à s'être intéressées à l'oligomérisation des sHsp en présence de fragments membranaires laissant encore de nombreuses zones d'ombre à la parfaite compréhension du mécanisme d'interaction entre les membranes et les protéines de stress.

OBJECTIFS DE LA THESE

Le milieu vin est un milieu présentant de nombreux stress environnementaux comme par exemple la présence d'éthanol ou un pH faible. Ces stress ont des conséquences très défavorables sur les microorganismes évoluant dans ce milieu. En effet, ils peuvent notamment agir (i) au niveau de leur membrane cytoplasmique qui peut alors perdre son intégrité et (ii) sur leurs protéines cellulaires qui auraient ainsi tendance à s'agréger. Pour pouvoir se développer dans ces milieux aux conditions de croissance hostiles, les microorganismes doivent donc mettre en place des mécanismes de réponse au stress. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la bactérie lactique *Oenococcus oeni* qui réalise une fermentation bénéfique pour les vins : la fermentation malolactique. Parmi les mécanismes d'adaptation de *O. oeni* aux conditions défavorables du vin, la synthèse de la protéine Lo18 occupe une place importante. Cette protéine a déjà été relativement bien caractérisée au sein du laboratoire : elle est synthétisée en réponse à de nombreux stress comme la présence d'éthanol, une augmentation de la température ou une variation de pH et possède une activité chaperon et lipochaperon *in vitro* et *in vivo* qui ne consomment pas d'ATP. Néanmoins, à ce jour, peu d'informations sont disponibles sur la structure de cette protéine lorsqu'elle exerce ses fonctions. De plus, la relation existant entre Lo18 et la membrane plasmique de *O. oeni* reste encore fortement méconnue. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse étaient les suivants :

1. Caractériser la relation structures - fonctions de la protéine de stress Lo18

Pour ce faire, une gamme de pH allant de 5 à 9 a été utilisée afin de générer des structures oligomériques différentes de la protéine Lo18. L'oligomérisation de cette sHsp a été caractérisée par filtration sur gel et par ultracentrifugation analytique (collaboration avec l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble). Pour chaque pH, le lien existant entre les structures quaternaires et les activités chaperon et lipochaperon *in vitro* de Lo18 a été étudié. L'impact de la modification de trois acides aminés dans le domaine α -cristallin de Lo18 a également été testé sur la structure quaternaire et les activités de cette protéine.

2. Etudier l'interaction entre la protéine Lo18 et la membrane plasmique de *O. oeni*

Dans ce but, des liposomes ont été fabriqués à partir de lipides extraits de la membrane de *O. oeni* lorsque cette bactérie est cultivée dans différentes conditions expérimentales. Les compositions en acides gras de ces liposomes ont été évaluées par chromatographie en phase gazeuse (collaboration avec l'Institut MICALIS de Massy). De plus, l'association de Lo18 avec la membrane a été caractérisée notamment en utilisant la technique d'anisotropie de fluorescence. Pour finir, l'oligomérisation de cette sHsp en présence de liposomes a été étudiée.

La présence de stress ayant un impact important sur les membranes bactériennes nous avons souhaité, dans un dernier temps, avoir une idée plus globale du type de réponse mise en place par *O. oeni* lors d'une modification de la fluidité de sa membrane cytoplasmique. Le troisième objectif de cette thèse était donc le suivant :

3. Identifier les mécanismes de réponse de la bactérie *O. oeni* suite à une fluidification

. .

La fluidification de la membrane de *O. oeni* a été obtenue par ajout d'un agent chimique fluidifiant : l'alcool benzylique (BA). Dans un premier temps, la concentration optimale de BA a été évaluée par des mesures de viabilité cellulaire (dénombrement sur milieu gélosé) et par détermination de la fluidité membranaire *in vivo* de *O. oeni* (anisotropie de fluorescence). L'impact de la fluidification membranaire a été également testé sur l'activité d'une protéine enchâssée dans la membrane plasmique de *O. oeni* : l' H^+ -ATPase. Pour finir, une étude globale du transcriptome bactérien après l'ajout de BA, a été réalisée en collaboration avec l'université de Vérone (Italie).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique

I.1. *Oenococcus oeni*

Deux souches de *Oenococcus oeni* ont été manipulées durant cette thèse.

La première est la souche de référence utilisée au laboratoire *O. oeni* ATCC BAA-1163 (anciennement appelée IOB 8413). Elle a été cultivée en anaérobiose à 30°C dans un milieu FT80 modifié (Cavin *et al.*, 1989) dont la composition est la suivante : extrait de levure : 5 g.L⁻¹, extrait de viande : 5 g.L⁻¹, KH₂PO₄ : 0,6 g.L⁻¹, MgSO₄ (7 H₂O) : 0,13 g.L⁻¹, MnSO₄ (1 H₂O) : 3 mg.L⁻¹, KCl : 0,45 g.L⁻¹, CaCl₂ (2 H₂O) : 0,13 g.L⁻¹, Tween 80 : 1 mL.L⁻¹, glucose : 5 g.L⁻¹, fructose : 3,5 g.L⁻¹, acide D-L malique : 10 g.L⁻¹, pH ajusté à 5,3 avec du NaOH. Le milieu a ensuite été stérilisé par autoclavage pendant 21 min à 121°C.

La souche *O. oeni* PSU-1, fournie par le Département de Biotechnologie de l'Université de Vérone (Italie) a été utilisée pour les études transcriptomiques. En effet, cette souche est séquencée et son génome est assemblé et annoté (contrairement à la souche ATCC BAA-1163 dont le génome n'est pas encore assemblé dans les bases de données). Elle a été cultivée en anaérobiose à 30°C dans un milieu MRS modifié dont la composition est la suivante : MRS_{Fluka} : 51 g.L⁻¹, fructose : 5 g.L⁻¹, acide malique : 1 g.L⁻¹, tween 80 : 1 mL.L⁻¹, pH ajusté à 4,8 avec du HCl. Le milieu a été stérilisé par filtration (0,45 µm).

I.2. *Escherichia coli*

Le génome de *O. oeni* étant difficilement manipulable, la protéine Lo18 a été surproduite en système hétérologue chez *E. coli* afin d'être purifiée. La souche BL21 star de *E. coli* a été transformée par les plasmides d'expression pET28a ou pET9d qui possèdent le gène *hsp18* codant pour la protéine Lo18 : ces souches sont respectivement appelées *E. coli* BL21xpET28a *hsp18* ou *E. coli* BL21xpET9d *hsp18* (Coucheney, 2005; Ronez, 2012; Weidmann *et al.*, 2010). Le gène *hsp18* est sous le contrôle d'un promoteur fort T7 inductible à l'IPTG. Ces plasmides contiennent également un gène de résistance à la kanamycine assurant une pression de sélection pour les souches transformées.

Quatre souches de *E. coli* BL21 star permettant la production de protéines modifiées ont été utilisées (Figure 34) :

- trois possèdent des mutations ponctuelles dans le domaine α-cristallin : *E. coli* BL21xpET28a *hsp18* Y107A, *E. coli* BL21xpET28a *hsp18* V113A et *E. coli* BL21xpET28a *hsp18* A123S (respectivement abrégées Y107A, V113A et A123S) (Coucheney, 2005; Weidmann *et al.*, 2010),
- une souche produit la protéine Lo18 délétée de 27 acides aminés du côté N-terminal : *E. coli* BL21xpET9d *hsp18* ΔN27 (abrégée ΔN27) (Ronez, 2012).

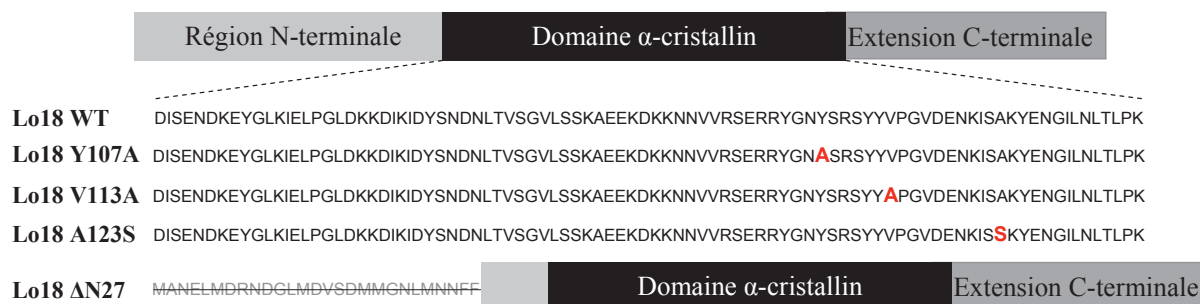


Figure 34 : Séquence nucléotidique des sHsp Lo18 sauvage ou modifiées utilisées.

Les souches de *E. coli* BL21 sont cultivées à 37°C en aérobiose sous agitation (130 rpm) dans un milieu Luria-Bertani (tryptone : 10 g.L⁻¹, NaCl : 5 g.L⁻¹, extrait de levure : 5 g.L⁻¹) supplémenté en kanamycine (50 µg.mL⁻¹). Un ensemencement à 1% a été réalisé à partir d'une préculture cultivée dans les mêmes conditions.

I.3. Conditions de stress

Afin d'étudier la réponse au stress de *O. oeni*, cette bactérie a été cultivée dans différentes conditions de stress : (i) stress thermique (30 min à 42°C) qui sert de stress de référence, (ii) stress éthanol (FT80m supplémenté avec 8% d'éthanol (v/v) pendant 5 min, 30 min ou 36 h), (iii) stress acide (culture en FT80m dont le pH a été préalablement ajusté à 3,5) (iv) stress alcool benzylique (BA) (60 mM d'alcool benzylique final pendant 5 ou 30 min).

II. Purification de la protéine Lo18 et des protéines modifiées

La surproduction des protéines Lo18 sauvage ou modifiées a été réalisée en système hétérologue chez *E. coli* et leur purification a été réalisée selon Coucheney *et al.* (2005). Lorsque la culture bactérienne atteint la phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,5$), la surproduction était induite avec 50 µM d'IPTG pendant 3 heures à 37°C et sous agitation. Les cellules ont été ensuite récoltées par centrifugation (5 000 rpm, 10 min, 15°C). Après lavage dans un tampon tris-HCl 20 mM, NaCl 250 mM pH 8 (tampon A), le culot est repris dans 7 mL de ce même tampon. L'extrait protéique brut est obtenu par casse des cellules au disrupteur (Z Plus Series Cee, Constant system Ltd.) qui fonctionne selon le principe d'extrusion des bactéries à haute pression. La casse est effectuée par un passage unique à 1,4 kbars. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (7 000 rpm, 20 min, 4°C) puis le surnageant est filtré sur filtre de 0,22 µm. Les protéines sont ensuite purifiées en une seule étape par chromatographie basse pression en phase liquide sur l'appareil Äkta Purifier (GE Healthcare, France) à l'aide d'une colonne d'interactions hydrophobes RESOURCE HIC-Phe 1mL (GE Healthcare, France) préalablement équilibrée avec du tampon A. Cette méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur hydrophobicité en utilisant des interactions réversibles entre un mélange de protéines et un milieu hydrophobe contenu dans une colonne chromatographique ; l'élution des protéines hydrophobes est ensuite provoquée par une diminution de la salinité du tampon (Figure 35).

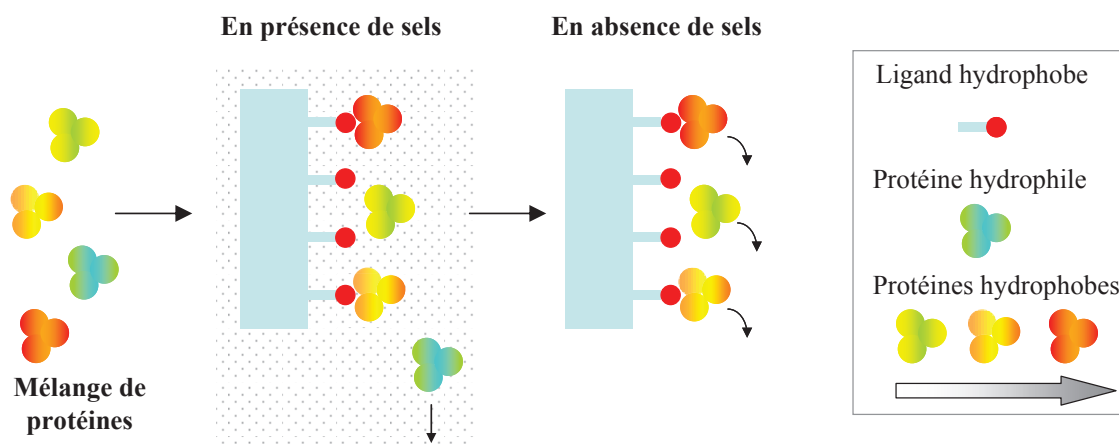


Figure 35 : Schéma simplifié représentant le principe de la chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC).

Dans notre cas, le tampon A permet l'élution des protéines polaires et la fixation des protéines hydrophobes sur les groupements phényles de la colonne. Le passage du tampon B (tris-HCl 20 mM pH 8) permet, à son tour, l'élution des protéines hydrophobes constituées des protéines Lo18 sauvage ou modifiées. Un chromatogramme type obtenu lors de la purification est présenté en Figure 36.

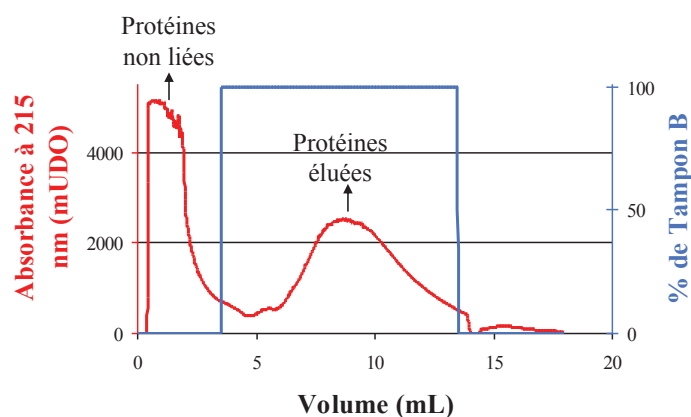


Figure 36 : Chromatogramme type obtenu lors de la purification de la protéine Lo18 sauvage par chromatographie d'interactions hydrophobes.

Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont ensuite collectées et concentrées à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration contenant un filtre en cellulose régénérée dont le seuil de coupure est de 10 kDa. La protéine est ensuite dialysée avec du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7, concentrée à 3 mg.mL⁻¹ et conservée à - 20°C. La pureté de la protéine est vérifiée sur gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (Figure 37).

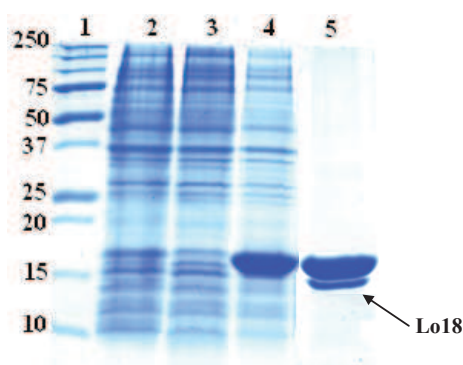


Figure 37 : Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie des différentes fractions cellulaires obtenues lors de la purification de la protéine Lo18 sauvage. 1 : marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein (BioRad) (poids moléculaire en kDa), 2 : préculture, 3 : culture avant induction, 4 : culture après induction à l'IPTG (50 μ M), 5 : protéine après purification.

Dans le dernier puits correspondant à la protéine purifiée, deux bandes sont observées. La première correspond à la protéine Lo18 native et la seconde à la protéine Lo18 délétée de 27 acides aminés en partie N-terminale. Cette délétion pourrait correspondre à la perte d'un bras labile de la protéine.

III. Détermination du degré d'oligomérisation

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer les structures quaternaires des protéines Lo18 sauvage ou modifiées : la chromatographie d'exclusion moléculaire et l'ultracentrifugation analytique.

III.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire

La méthode de chromatographie d'exclusion (SEC), également appelée filtration sur gel (GF), permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les molécules ne se lient pas à la colonne mais passent à travers un maillage moléculaire créé par une matrice poreuse constituée de particules sphériques : plus les protéines d'intérêt seront petites, moins elles seront éluées vite et inversement (Figure 38). Il est ensuite possible de relier la masse moléculaire des protéines avec leur volume d'élution grâce à l'utilisation de standards.

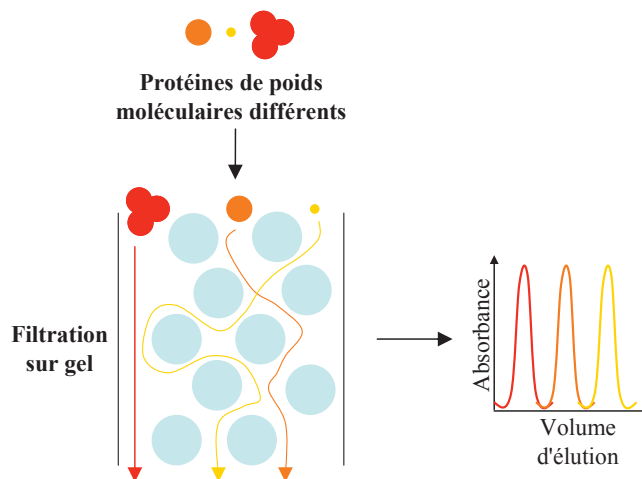


Figure 38 : Schéma simplifié représentant le principe de la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Dans notre cas, cette méthode nous a permis de déterminer l'état oligomérique de 300 µg de protéine Lo18 sauvage ou modifiée. Un système Äkta Purifier (GE Healthcare, France) équipé d'une colonne Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare, France) préalablement équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ à 10°C ont été utilisés. Les absorbances à 215 nm et 280 nm ont été mesurées en continu et des fractions de 1 mL ont été collectées puis analysées sur gel SDS-PAGE. Pour la calibration de la colonne, les protéines suivantes ont été utilisées : ovalbumine (43 kDa), conalbumine (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritine (440 kDa), thyroglobuline (669 kDa) et bleu Dextran (2 000 kDa). Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

III.2. Ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique (AUC) permet la séparation de macromolécules en solution en fonction de leur coefficient de sédimentation qui dépend de la masse moléculaire de la particule considérée. Pour ce faire, lors d'une centrifugation, l'absorbance des molécules d'intérêt, comme par exemple de protéines, est mesurée afin de suivre leur répartition dans une cellule de centrifugation au cours du temps. Lors de la centrifugation, les molécules se répartissent dans la cellule suivant leur masse moléculaire grâce à la force centrifuge (Figure 39).

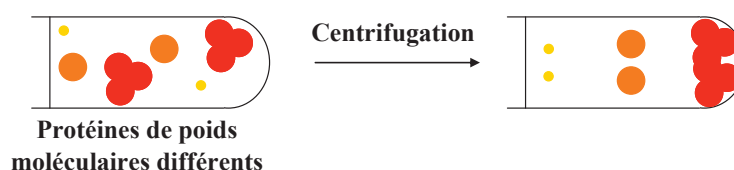


Figure 39 : Schéma simplifié du principe d'ultracentrifugation analytique.

La position des particules dans la cellule de centrifugation dépend de leur coefficient de sédimentation, noté s , qui caractérise les molécules dans leur milieu. Le coefficient de sédimentation, exprimé en Svedberg, est calculé grâce à l'équation de Svedberg comme suit : $s = M(1 - \rho \bar{v}) / N_A f$ où M est la masse moléculaire de la biomolécule d'intérêt, $(1 - \rho \bar{v})$ exprime la différence de densité entre la particule et le solvant dans lequel elle se trouve : ρ est la densité du solvant et $\bar{v}$ le volume partiel spécifique du solvant, N_A est le nombre d'Avogadro et f traduit le coefficient de friction. Ce coefficient de friction dépend de la relation de Stokes suivante : $f = 6\pi \eta R_s$ où η exprime la viscosité du solvant et R_s est le rayon hydrodynamique (également appelé rayon de Stokes) qui est directement lié à la forme de la particule d'intérêt. L'expression des coefficients de sédimentation ainsi obtenue est souvent corrigée par la viscosité et la densité du solvant donnant ainsi un s_{20w} qui correspond au coefficient de sédimentation qu'aurait la macromolécule si la mesure avait été réalisée à 20°C et non pas dans un tampon mais dans l'eau.

Les profils de sédimentation de la protéine Lo18 sauvage et de la protéine A123S ont été obtenus par ultracentrifugation analytique à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (en collaboration avec

C. Ebel, A. Appourchaud, J. Covès) en utilisant une ultracentrifugeuse Beckman XL-I équipée d'un rotor AN-50 TI (Beckman Coulter). Trois concentrations de protéines différentes ont été testées : 13, 34 et 68 μM (correspondant respectivement à une absorbance à 280 nm de 0,2, 0,5 et 1). Les expériences ont été réalisées à 20°C dans un tampon phosphate de sodium à 50 mM à pH 7. Les protéines testées ont été introduites dans une cellule de 12 mm contenant deux canaux et équipée d'une fenêtre en saphir. Les profils de sédimentation ont été obtenus lors d'une centrifugation à 50 000 rpm pendant environ 1 nuit. Des mesures d'absorbance à 275 nm et d'interférence ont été réalisées toutes les 12 minutes au cours de la centrifugation. Les données brutes obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du programme Sedfit (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>) en considérant 200 particules dont les coefficients de sédimentation sont compris entre 0,1 et 20 S, un f/f_{min} de 1,25 (ce qui correspond à une macromolécule globulaire compacte) et en utilisant un niveau de confiance de 0,68. Le logiciel Sednterp (<http://www.jphilo.mailway.com>) nous a permis d'estimer le volume partiel spécifique des chaînes polypeptidiques testées ($\bar{v}_{\text{Lo18}} = 0,7205$ and $\bar{v}_{\text{A123S}} = 0,7199$ mL.g⁻¹), la densité ainsi que la viscosité du solvant utilisé à 20°C ($\rho = 1,004$ g.mL⁻¹, $\eta = 1,023$ cP) ces données étant nécessaires pour l'analyse de la distribution des coefficients de sédimentation notée $c(s)$ et aux calculs des coefficients de sédimentation s .

III.3. Microscopie électronique

La microscopie électronique, réalisée en collaboration avec la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (D. Fenel, G. Schoehn, J. Covès), a permis d'observer directement les complexes oligomériques formés par la protéine Lo18 à différents pH après coloration négative. Pour la coloration, la protéine Lo18 a été diluée à 3 μM (soit environ une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹) dans un tampon phosphate à 50 mM au pH désiré. Quatre μL de ces échantillons ont ensuite été déposés sur une interface carbone/mica et colorés négativement avec 2% d'acétate d'uranyle (w/v). Les clichés microscopiques ont été réalisés avec un microscope électronique FEI CM12 LaB6 fonctionnant à 120 kV et une caméra Orius SC1000 GATAN CCD (1,55 Å / pixel) avec un grossissement nominal x 45 000. Une image de l'organisation spatiale de Lo18 à pH 5 a été obtenue à l'aide d'une analyse d'image basée sur 800 particules provenant de 12 clichés différents en utilisant le logiciel X3D (Conway & Steven, 1999). Une image montrant très clairement une symétrie circulaire a été utilisée pour créer un modèle de départ en 3 dimensions et a permis de générer une procédure de projection comme décrit par Franzetti et ses collaborateurs (Franzetti *et al.*, 2002). Après 20 cycles d'amélioration, une symétrie D8 (2 anneaux empilés entre eux suivant une symétrie à 8 pans) est apparue et a été imposée pour la reconstruction tridimensionnelle du modèle. Cette reconstruction a ensuite subi 29 cycles d'amélioration en incluant 29 nouvelles projections et 190 images brutes. La résolution finale du modèle a été limitée à 30 Å à cause du faible nombre d'images utilisées pour la construction du modèle en 3D. Pour la représentation de l'isosurface, la masse

moléculaire exacte du complexe (16-mere) a été employée ainsi qu'une densité protéique moyenne de 0,84 Da. Å⁻³.

La structure cristalline d'un monomère de Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* (PDB code 1SHS) a été superposée à la carte densitométrique obtenue par microscopie électronique de la protéine Lo18 avec le programme VEDA (<http://mem.ibs.fr/VEDA>).

IV. Détermination de l'activité chaperon moléculaire

L'activité chaperon moléculaire de Lo18 et des protéines modifiées est évaluée par leur capacité à protéger la citrate synthase (CS) de l'agrégation thermique. En effet, la température provoque l'apparition d'agrégats insolubles de CS qui absorbent à une longueur d'onde de 360 nm.

IV.1. Préparation de la citrate synthase

La CS de cœur de porc utilisée est commercialisée en tampon sulfate d'ammonium (Sigma). Pour son utilisation, la CS est dialysée avec un tampon TE (50 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) puis concentrée à 17 mg.mL⁻¹ à 4°C grâce à un Amicon (seuil de coupure = 10 kDa). Une centrifugation à 14 000 rpm pendant 30 min à 4°C permet l'élimination des protéines précipitées puis le surnageant contenant la CS non dénaturée est concentré à 30 µM (monomère) et conservé à - 20°C.

IV.2. Mesure de l'agrégation thermique de la citrate synthase

L'agrégation de la CS est suivie au cours du temps par la mesure de l'absorbance à 360 nm. 300 nM de CS sont dénaturés à 45°C dans un tampon phosphate de sodium à 50 mM au pH désiré en présence ou en absence de 1,2, 4,8 ou 9,6 µM de protéine Lo18 sauvage ou modifiée. L'agrégation de la CS est mesurée par un spectrophotomètre Uvicon XS70 équipé d'un thermosystème Peltier (Secoman, Bioserv, France). Chaque expérience est réalisée en triplicat. Le lysozyme est utilisé comme témoin négatif car il ne présente aucune activité chaperon moléculaire et possède une masse moléculaire proche des protéines étudiées. Lorsque l'activité chaperon est réalisée en présence de liposomes les ratios Lo18:liposomes utilisés sont les suivants : 1:25, 1:2, 1:0,3 et 1:0,04 (m/m) ce qui correspond respectivement à 9250, 925, 92,5 et 12,5 µg de lipides.

V. Détermination de l'activité de régulation de la fluidité membranaire

V.1. Extraction des lipides membranaires de *Oenococcus oeni* et fabrication de liposomes natifs

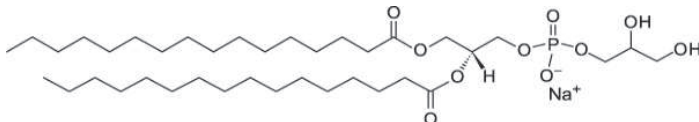
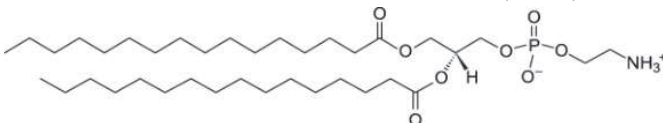
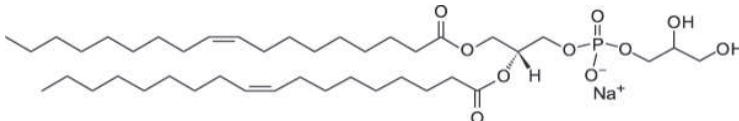
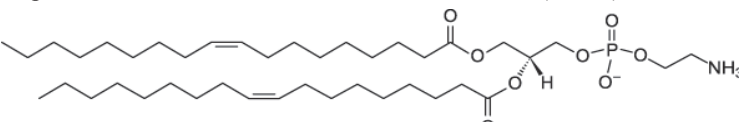
L'extraction des lipides membranaires est réalisée selon Coucheney *et al.* (2005) sur 50 UDO (1 UDO = 2.10⁸ UFC.mL⁻¹) provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} = 0,5) de *O. oeni* ATCC BAA-1163. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (5 000 rpm, 10 min, 15°C) puis les lipides membranaires sont extraits à l'aide d'un mélange méthanol - chloroforme - eau

(2,5:2,5:2,25) (Bligh & Dyer, 1959). La phase chloroforme - méthanol contenant les lipides membranaires est récupérée après centrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4°C) et évaporée à 65°C sous vide grâce à un rotavapor (Rotary Evaporator RE100 Bibby, Odil, France). Le film lipidique obtenu est ensuite repris dans 10 mL d'un tampon phosphate de sodium 50 mM au pH désiré préalablement chauffé à 65°C : on obtient ainsi des vésicules multilamellaires (MLV). Afin de réaliser des petites vésicules unilamellaires (SUV), deux traitements aux ultrasons (ELMA D-78224, VWR, France) de 30 secondes sont réalisés. En revanche, pour obtenir des vésicules unilamellaires larges (LUV), les MLV sont extrudés en réalisant 11 passages au travers d'une membrane de polycarbonate percée de pores de 100 nm de diamètre (Mini extruder, Avanti Polar Lipids Inc., USA). Les liposomes sont conservés sous azote à 4°C pendant 7 jours maximum.

V.2. Fabrication de liposomes synthétiques

Les liposomes synthétiques sont préparés à partir des lipides commerciaux suivants : 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoglycérol (DPPG), 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine (DPPE), 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoglycérol (DOPG), 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine (DOPE) (Avanti Polar Lipids Inc., USA) dont les caractéristiques et la formule chimique sont présentées dans le Tableau IV.

Tableau IV : Caractéristiques des phospholipides commerciaux utilisés.

Nom	Tête polaire	Acide gras	Température de transition de phase
DPPG : 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoglycérol	Glycérol	Acide palmitique (C16:0)	$T_M = 41^\circ\text{C}$
			
DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine	Ethanolamine	Acide palmitique (C16:0)	$T_M = 63^\circ\text{C}$
			
DOPG : 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoglycérol	Glycérol	Acide oléique (C18:1)	$T_M = -18^\circ\text{C}$
			
DOPE : 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine	Ethanolamine	Acide oléique (C18:1)	$T_M = -16^\circ\text{C}$ $T_{LH} = 10^\circ\text{C}$
			

Dès réception, les lipides sont dissous dans du chloroforme pur afin d'obtenir des solutions stocks à 30 mM qui sont conservées sous azote à -20°C afin de limiter leur oxydation. Les liposomes sont obtenus en mélangeant 100 µL de solution stock avec 900 µL de mélange chloroforme - méthanol (1:2). Le chloroforme et le méthanol sont évaporés à 65°C sous vide grâce à un rotavapor (Rotary Evaporator RE100 Bibby, Odil, France). Le film lipidique obtenu est ensuite repris dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 préalablement chauffé à 65°C puis les SUV ou les LUV sont réalisés comme mentionné précédemment (paragraphe V.1).

V.3. Mesures d'anisotropie de fluorescence

La fluidité membranaire est mesurée par la méthode d'anisotropie de fluorescence (dont le principe est décrit dans le paragraphe III. 2. 2.) à l'aide d'un spectrofluorimètre (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon) appartenant à la Plateforme DimaCell de l'IFR 192 à Dijon. La mesure de fluidité est réalisée sur cellules entières ou sur des liposomes natifs ou synthétiques préparés comme décrit ci-dessus.

Mesure *in vivo* de la fluidité membranaire : 50 UDO de cellules *O. oeni* sont récoltées en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,4$) puis lavées deux fois dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g.L⁻¹). La densité optique de la culture est ensuite ajustée à $DO_{600} = 0,6$ dans un tampon MES - glucose (composition pour 1L : acide 2-[N-morpholino]éthane sulfonique (MES) : 50 mM, glucose : 10 mM, pH ajusté à 4,8 avec du KOH). Pour la mesure de l'anisotropie, 15 µM de sonde fluorescente 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) (Molecular Probes) diluée dans du tétrahydrofurane (THF) sont ajoutés à 3 mL de suspension cellulaire. Lorsque la sonde est bien insérée dans les cellules (environ 10 min), un choc BA 60 mM est réalisé et la fluidité membranaire est mesurée pendant 1h avec une mesure d'anisotropie toutes les 8 secondes. Au cours de l'expérience la température est maintenue à 30°C par un système Peltier thermoélectrique (Wavelength Electronics Inc., USA). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la sonde sont fixées, respectivement, à 352 et 402 nm. Les valeurs d'anisotropie sont automatiquement calculées par le spectrofluorimètre (Shinitzky, 1984). Toutes les expériences sont réalisées en triplicat.

Mesure *in vitro* de la fluidité membranaire : 250 µL de liposomes natifs ou synthétiques (soit environ 1,5 mg de lipides) sont additionnés de 9 mM de sonde hydrophobe DPH ($C_f = 3 \mu\text{M}$) en absence ou en présence de 10 µM de Lo18 sauvage ou modifiée (soit un ratio Lo18:liposomes de 1:2 m/m). La sonde va pouvoir s'insérer dans les liposomes lors d'une phase de maintien de la température à 15°C pendant 10 minutes puis une rampe de température allant de 15 à 70°C (augmentation de la température de 2 ou 5°C par minute avec une mesure d'anisotropie toutes les 8 secondes) est réalisée. Toutes les expériences sont réalisées en triplicat ; le lysozyme est utilisé comme témoin négatif.

V.4. Détermination de la composition en acides gras membranaires

Les compositions en acides gras membranaires ont été déterminées à l'Institut MICALIS - AgroParisTech à l'INRA de Massy (en collaboration avec F. Dubois-Brissonnet) sur :

(i) 50 UDO de cellules entières de *O. oeni* ATCC BAA-1163 préalablement lavées avec de l'eau physiologique ($\text{NaCl} : 9 \text{ g.L}^{-1}$) et cultivées dans :

- un milieu FT80m pH 5,3 (conditions optimales de croissance) et prélevées en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$),

- un milieu FT80m pH 5,3 (conditions optimales de croissance) et prélevées en phase stationnaire ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,7$),

- un milieu FT80m pH 5,3 additionné de 8% d'éthanol et prélevées en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$),

- un milieu FT80m pH 3,5 et prélevées en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$).

(ii) 1 mL de liposomes (SUV) préparés comme décrit précédemment (paragraphe V.1) à partir de *O. oeni* ATCC BAA-1163 cultivée dans les conditions citées ci-dessus.

L'extraction et la méthylation des acides gras ont été réalisées selon Méchin *et al.* (1999) : les lipides ont été saponifiés pendant 30 min à 100°C avec du HCl à 3,25 M dilué dans une solution de méthanol à 45% (v/v) (Méchin *et al.*, 1999). Les esters méthylés d'acides gras (FAMES) ont ensuite été extraits à l'aide d'un mélange d'ester de diéthyle et de cyclohexane (1:1 v/v) puis la phase organique a été lavée avec du NaOH à 0,3 M. Dans le cas des liposomes, une concentration des échantillons sous flux d'azote a été nécessaire. Les FAMES ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette méthode permet de les séparer en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire contenue dans une colonne. Le mélange de composés à analyser est injecté puis vaporisé dans un four pour être transporté par un gaz vecteur (souvent de l'hélium, de l'argon ou de l'azote) dans la colonne. Les composés sont retenus par la colonne selon l'affinité qu'ils ont pour la phase stationnaire. A leur sortie, ils sont détectés et quantifiés puis l'enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme représentant l'intensité de chacun des composés en fonction de leur temps de rétention respectif (Figure 40). Les FAMES peuvent ensuite être identifiés à l'aide de standards commerciaux.

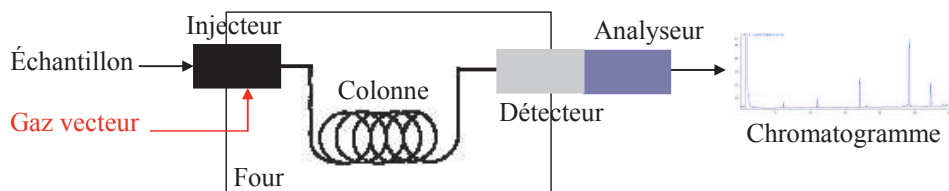


Figure 40 : Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse.

Dans notre cas, nous avons utilisé un système 6890HP (Agilent Technologies, France) équipé d'une colonne capillaire (25 m, 0,22 mm diamètre) recouverte de 0,25 μm d'une matrice BPX 70 (SGE, Ring Wood, Australie) et d'un détecteur à photométrie de flamme. La température de la colonne a été

fixée à 100°C pendant 1 min puis augmente jusqu'à 170°C avec une vitesse de 2°C.min⁻¹. Les données ont été quantifiées puis traitées par un système HPCORE Chemstation (Agilent Technologies, France) et sont exprimées en pourcentage (aire du pic d'intérêt / aire des pics principaux). Chaque échantillon a été injecté deux fois et les expériences ont été réalisées sur trois extractions indépendantes.

VI. Immunoblotting et cross-linking au BS³

Afin de visualiser la présence de la protéine Lo18 des expériences d'immunoblotting ont été réalisées sur (i) des extraits cellulaires de *O. oeni* ATCC-BAA-1163 ou (ii) sur de la protéine Lo18 purifiée et cross-linkée.

Les échantillons sont préparés comme suit :

40 UDO de cellules entières de *O. oeni* cultivées en conditions optimales de croissance (milieu FT80m pH 5,3) ont été récoltées en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4$) et traitées avec 60 mM de BA pendant 5 et 30 min ou incubées pendant 30 min à 42°C (stress de référence). Pour chaque expérience, un échantillon non traité a été utilisé comme contrôle. Les bactéries ont ensuite été lavées dans de l'eau physiologique (NaCl : 9 g.L⁻¹) et centrifugées à 5 000 rpm pendant 10 min à 15°C. Le culot cellulaire de chaque échantillon a été repris dans 5 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7. L'extrait protéique brut a été obtenu par casse des cellules au disrupteur (Z Plus Series Cee, Constant system Ltd.) par 3 passages à 2,2 kbars. Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par centrifugation (7 000 rpm, 20 min, 4°C). Après dosage des extraits protéiques par la méthode de Bradford, environ 60 µg de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide. Si les échantillons présentaient une concentration protéique trop faible ils ont été précipités à l'acide TriChloroAcétique (TCA). Pour ce faire, 1 mL d'extrait cellulaire a été supplémenté avec du TCA ($C_f = 17\%$) et les protéines ont été précipitées pendant minimum 1h à 4°C. Les protéines précipitées ont été centrifugées (10 000 rpm, 10 min, température ambiante), lavées 3 fois avec de l'acétone à 90% (v/v) puis reprises dans du tampon de charge (tampon Laemmli) et chauffées 5 min à 95°C avant d'être séparées sur gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

La protéine Lo18 pure (1,5 µM) est dans un premier temps incubée en présence ou en absence de liposomes (ratio Lo18:liposomes = 1:2 m/m) pendant 5, 15, 30 ou 60 min à 42°C. Dans un second temps, un cross-linking est réalisé par addition de 2 mM de bis(sufosuccinimidyl) subérate (abrégié BS³) préparé extemporanément dans le tampon suivant : 25 mM MES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,5 mM DTT. Le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante (Delmas *et al.*, 2001; Leroux *et al.*, 1997). Ensuite, 1,7 ou 2,6 µg de Lo18 cross-linkée ont été séparés sur gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide.

Ensuite, les expériences immunoblotting ont été réalisées comme précédemment décrit par Guzzo *et al.* (1998). Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, cette méthode utilise un

anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine Lo18 qui est dilué au 1/1000 et un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase qui est dirigé contre l'anticorps primaire. Le second anticorps est détecté par chimioluminescence (ECL, Amersham) (Figure 41).

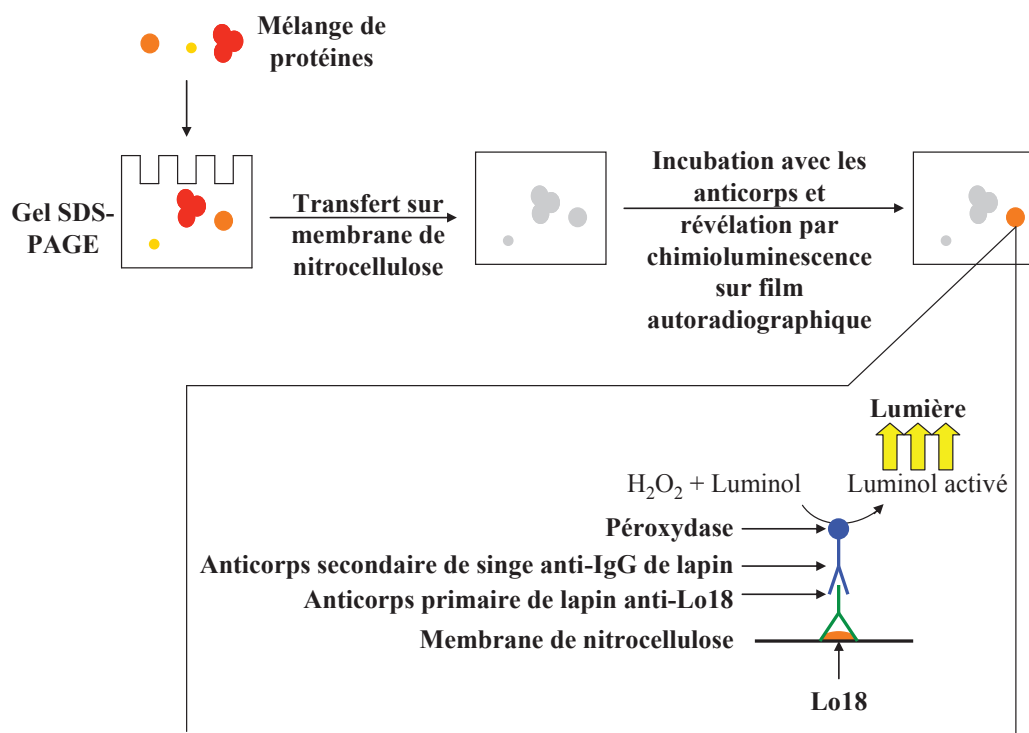


Figure 41 : Schéma représentant les étapes de l'immunoblotting permettant la révélation de Lo18.

VII. Mesure de viabilité cellulaire

Des expériences de viabilités cellulaires de *O. oeni* ATCC BAA-1163 ont été réalisées en présence de plusieurs concentrations de BA choisies suivant les travaux de Delmas *et al.* (2001) : 30, 60, 100 et 120 mM. Les dénombrements ont été effectués sur des cultures en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,4$ soit environ $2 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹) sur milieu gélosé FT80m après incubation à 30°C pendant 5 jours. L'impact des différentes concentrations en BA sur la viabilité cellulaire de *O. oeni* a alors été évalué par comparaison avec la suspension cellulaire en absence de BA. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

VIII. Mesure de l'activité H⁺-ATPasique membranaire

Le dosage de l'activité spécifique H⁺-ATPasique a été effectué sur les membranes bactériennes de 20 UDO de *O. oeni* ATCC BAA-1163 en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,4$). Les cellules sont incubées en présence ou en absence de BA puis les membranes ont été préparées comme décrit par Tourdot-Maréchal *et al.* (1999). L'extrait membranaire (20 µL) est incubé pendant 25 minutes à 37°C avec un milieu réactionnel contenant 50 mM de MES, 5 mM d'ATP et 13 mM de MgCl₂, pH 6. La consommation de l'ATP a été stoppée par ajout de 300 µL SDS 1% (m/v) et le phosphate libéré a été mis en évidence par l'ajout de 500 µL de mélange métol - molybdate. Les

échantillons ont été incubés pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. L'apparition du phosphate a été mesurée par réaction colorimétrique à 740 nm. Une gamme étalon (0,02 μmol à 0,16 μmol par cuve) a été réalisée dans les mêmes conditions avec du KH_2PO_4 à 2 mM. L'activité spécifique ATPasique est exprimée en μmoles de phosphate libéré par mg de protéines membranaires et par minute. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

Pour déterminer l'activité spécifique H^+ -ATPasique, il est nécessaire de connaître la concentration en protéines membranaires des échantillons. Celle-ci a été mesurée par la technique de Bradford à l'aide du réactif de dosage Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad, France) dilué au 1/3. Une gamme étalon allant de 2,5 mg.L^{-1} à 12,5 mg.L^{-1} a été réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA).

IX. Etude transcriptomique : Préparation d'ARNm en vue d'une hybridation sur biopuces CombiMatrix

Cette étude transcriptomique a été réalisée en collaboration avec le Département de Biotechnologie de l'Université de Vérone (Italie) (E. Stefanelli, G. Felis, S. Toriani). Le but était de comparer l'expression des gènes de la bactérie *O. oeni* PSU-1 lorsque celle-ci est soumise ou non à un stress BA (60 mM) pendant 5 ou 30 minutes afin de voir quels sont les gènes impliqués dans la réponse à une fluidification de sa membrane.

IX. 1. Extraction des ARN totaux et traitement à la DNase

Les extractions d'ARN ont été réalisées à l'aide du kit PureLinkTM RNA mini kit commercialisé par la société Ambion. Les extractions ont été pratiquées sur 10^9 bactéries cultivées dans trois conditions expérimentales différentes : une condition témoin (croissance 50 h dans un milieu MRSm à 30°C) et deux conditions de stress (croissance 50 h dans un milieu MRSm à 30°C puis ajout de 60 mM de BA pendant 5 ou 30 min). Les cellules ont été lysées par lyse chimique dans un tampon TE (tris-HCl : 10 mM pH 8, EDTA : 0,1 mM), en présence de 1 mg de lysozyme et de SDS 1%. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation (14 000 rpm, 2 min, 4°C), les acides nucléiques ont été lavés dans l'éthanol absolu. Les ARN ont ensuite été purifiés sur colonne selon les conditions indiquées par le fournisseur (Ambion).

80 μL d'ARN purifiés ont été traités avec 100 U de DNase I (Roche), selon les conditions du fournisseur, afin d'éliminer toute trace d'ADN pouvant provenir de l'extraction. Les ARN extraits ont été dosés par mesure d'absorbance à 260 et 280 nm (Nanodrop, Fischer). L'absence d'ADN ainsi que l'intégrité des ARN extraits ont été vérifiées par électrophorèse capillaire (BioAnalyzer, Agilent RNA 6000 Nano kit). Cette méthode permet d'estimer avec précision le temps d'éluion des ARN 16S et 23S puis de calculer un « RNA Integrity Number » (RIN) : un RIN supérieur à 7 traduit des ARN de bonne qualité et non dégradés. Un exemple est présenté en Figure 42.

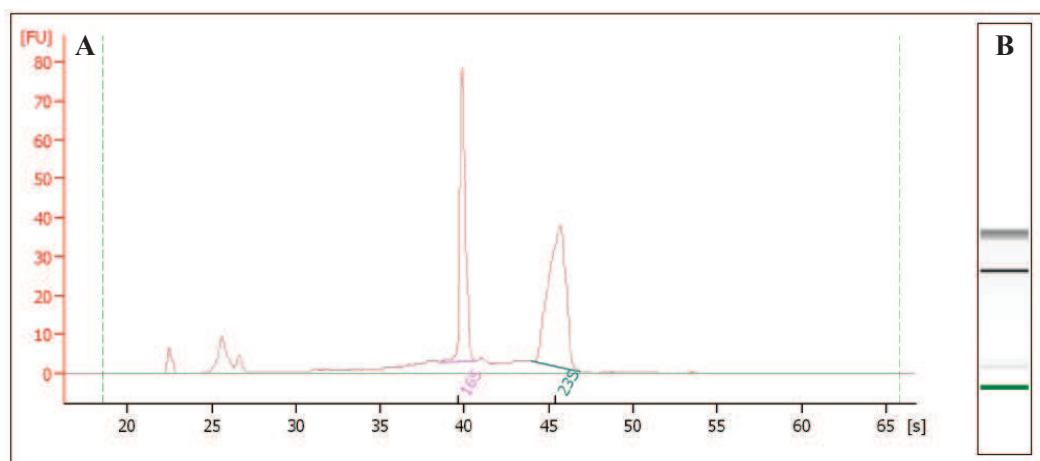


Figure 42 : Electrophorégramme obtenu par électrophorèse capillaire d'un échantillon d'ARN total. (A) Profil d'élution ; (B) Gel d'électrophorèse.

Le profil d'élution présenté (partie A) montre deux pics bien distincts correspondant aux ARN 16S et 23S. Ces ARN sont retrouvés sur le gel d'électrophorèse (partie B) sous forme de deux bandes principales bien distinctes (la bande verte correspondant au front de migration). Ces deux représentations traduisent des ARN de qualité satisfaisante. En effet, le RIN obtenu pour cet échantillon est de 8,8.

IX.2. Enrichissement des échantillons en ARNm

Avant l'hybridation des puces, une étape d'enrichissement est nécessaire afin de sélectionner les ARN messagers purs et en quantité importante. Cet enrichissement a été réalisé à l'aide du kit MICROBExpress™ (Ambion). Ce kit utilise une méthode d'hybridation par capture sandwich afin d'éliminer les ARNr 16S et 23S. Dix µg d'ARN totaux ont été incubés 15 min à 37°C dans un tampon de fixation avec des oligonucléotides de capture reconnaissant les ARN 16S et 23S. L'ajout de billes magnétiques, auxquelles sont greffées un oligonucléotide reconnaissant les oligonucléotides de capture, ont été ajoutées au mélange réactionnel lors d'une incubation de 15 min à 37°C (voir Figure 43).

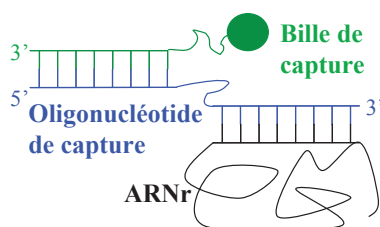


Figure 43 : Représentation schématique de la méthode de capture des ARNr pour l'enrichissement des ARNm.

Les billes magnétiques liées aux ARNr sont attirées sur un bord du tube à l'aide d'un aimant. Les ARNm enrichis contenus dans le surnageant ont ensuite été précipités dans de l'éthanol 100% froid et

resuspendus dans de l'eau RNase free. L'efficacité de l'enrichissement et l'intégrité des ARNm ont été vérifiées au Nanodrop et au BioAnalyzer (Figure 44).

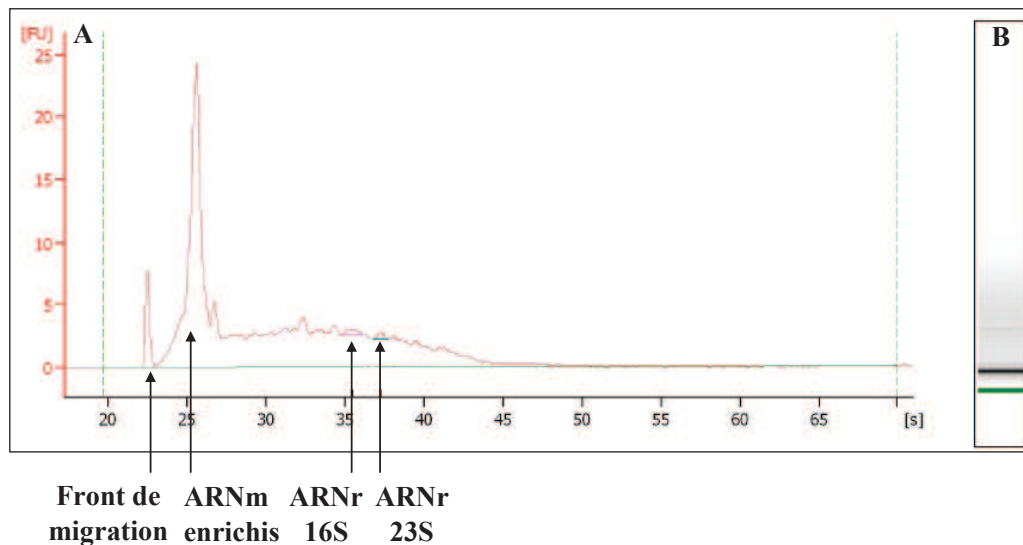


Figure 44 : Electrophorégramme obtenu par électrophorèse capillaire d'un échantillon enrichi en ARNm. (A) Profil d'élution ; (B) Gel d'électrophorèse.

Pour finir, le laboratoire de Génomique Fonctionnelle de Vérone (A. Ferrarini, P. Tononi) a amplifié les ARNm et les a transformés en ADNc puis marqués par un fluorochrome rouge, le Cy5, qui est un marqueur fluorescent de la famille des cyanines. Les ADNc marqués ont ensuite été fragmentés et hybridés à des biopuces Combimatrix qui contiennent des sondes d'ADN correspondant aux différents gènes de *O. oeni* PSU-1. Le marqueur fluorescent a ensuite été excité par un laser et une image haute résolution de la puce a été obtenue à l'aide d'un scanner : lorsqu'il y a eu hybridation, un spot coloré apparaît. L'intensité du signal obtenue a été corrélée avec l'expression du gène grâce à des techniques bioinformatiques. Les données trouvées en conditions de stress (BA 5 et 30 min) ont ensuite été comparées à la condition témoin puis une analyse bio-statistique a été réalisée. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

X. PCR quantitative

L'utilisation de biopuces nous a permis d'identifier un panel de gènes chez *O. oeni* PSU-1 dont l'expression est modifiée suite à un stress BA. Ces modifications transcriptomiques ont été confirmées par RT-qPCR chez cette souche. Ensuite, l'expression d'un panel de gènes d'intérêt a également été étudiée chez *O. oeni* ATCC BAA-1163 suite à des stress BA 60 mM ou des stress éthanol 8% (v/v).

X.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir de 4 UDO d'une culture de *O. oeni* ATCC BAA-1163 ou de *O. oeni* PSU-1 en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4$). Les bactéries ont été centrifugées (7 000 rpm, 10 min, 4°C) et le culot a été lavé dans un tampon tris-HCl 10 mM

pH 8. La paroi des bactéries a alors été dégradée à l'aide d'EDTA (25 mM) et de lysozyme (20 mg.mL⁻¹ final). L'ARN ainsi libéré a été détruit par des RNases (0,2 mg.mL⁻¹ final). Les débris cellulaires ont été précipités avec du perchlorate de sodium à 5 M. Deux extractions successives au phénol - chloroforme - alcool isoamylique puis au chloroforme ont été effectuées afin d'éliminer les protéines de l'échantillon. L'ADN se retrouve dans la phase aqueuse avant d'être précipité par de l'isopropanol. Le culot obtenu a été lavé à l'éthanol 70% (v/v) puis resolubilisé dans de l'eau ultra pure. Par la suite, les acides nucléiques ont été dosés par mesure d'absorbance à 260 nm et à 280 nm (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BioRad, France). Les échantillons d'ADN ont servi de témoin positif lors des expériences de PCR quantitative.

X.2. Extraction d'ARN et traitement à la DNase

Dans le cas de la vérification des données obtenues par les biopuces, les protocoles utilisés sont les mêmes que ceux présentés dans le paragraphe IX. 1 car les extractions d'ARN et le traitement à la DNase doivent être réalisés dans les mêmes conditions que lors des expériences transcriptomiques avec les biopuces.

Pour la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163, l'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir de 20 UDO de *O. oeni* cultivé dans différentes conditions :

- milieu FT80m pH 5,3, phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4$),
- milieu FT80m pH 5,3, phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4$) + BA 60 mM pendant 5 ou 30 min,
- milieu FT80m pH 5,3 supplémenté avec 8% d'éthanol (v/v) pendant 30 min, 15 h ou 36 h, phase exponentielle de croissance.

Pour les conditions de stress, les cultures ont été supplémentées en BA 60 mM pendant 5 ou 30 min ou avec 8% d'éthanol (v/v) pendant 30 min, 15 h ou 36 h. Le culot cellulaire des différents échantillons a été récupéré après centrifugation (7 000 rpm, 7 min, 10°C). Les bactéries ont été lysées dans un tampon TE (10 mM tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 8) contenant 3 mg.mL⁻¹ de lysozyme pendant 10 min à température ambiante. Les ARN ont ensuite été extraits à l'aide d'un kit RNeasy Mini (Sigma, France) selon les recommandations du fournisseur. Ils ont été dosés par mesure d'absorbance à 260 nm et à 280 nm (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BioRad, France). L'intégrité des ARN a été vérifiée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (m/v) coloré au bromure d'éthidium (BET). Ensuite, 4 µg d'ARN ont été traités avec 10 U de DNase (Fermentas, France), selon les conditions du fournisseur, afin de dégrader toute trace d'ADN pouvant provenir de l'extraction. L'élimination de l'ADN de l'échantillon a ensuite été vérifiée par PCR quantitative.

X.3. Reverse transcription et PCR en temps réel

Pour la reverse transcription, 2 µg d'ARN traité à la DNase ont été transcrits en ADNc à l'aide d'un kit de synthèse d'ADNc iScript (BioRad, France) selon les conditions du fournisseur.

La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est une méthode d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADNc, à partir d'amorces spécifiques et d'une ADN polymérase thermostable : la *Taq*-polymérase. Cette technique est basée sur une répétition de cycles constitués de trois étapes : (i) une phase de dénaturation qui permet la séparation des deux brins d'ADN, (ii) une phase d'hybridation des amorces et (iii) une phase d'élongation permettant aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire à leur ADN matrice. Cette méthode est dite quantitative car elle consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent : le SYBR[®] Green. Cet agent intercalent émet de la fluorescence quand il est intégré dans un double brin d'ADN. L'intensité de la fluorescence détectée est alors proportionnelle à la concentration d'ADNc présente dans le milieu. Cette technique a pour but de déterminer les quantités relatives d'ARN messagers.

X.3.1 Choix des amorces

Un panel de gènes a été choisi d'après les résultats obtenus par les biopuces pour être amplifié par RT-qPCR. Les séquences des amorces ont été dessinées et produites par la société Sigma (France). Les séquences nucléotidiques des amorces correspondant aux gènes sélectionnés sont présentées dans le Tableau V.

Les amorces déterminées sont optimales lorsqu'elles possèdent (i) une longueur de 20-25 pb, (ii) environ 50% de GC, (iii) une température d'hybridation proche de 60°C. Leur incapacité à former des structures secondaires et des dimères a été évaluée par le logiciel Oligo Analyser 1.0.3 et leur spécificité est testée par qPCR en utilisant l'ADN génomique comme matrice.

Tableau V : Séquences des amorces utilisées.

Gène cible	Produit du gène	Séquence de l'amorce sens (5'→3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>ldhD</i>	D-lactate dehydrogenase	GCGCAGTAAGAACTTGATG	TGCCGACAAACCAACTGTTT	102
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	CGCCCGACAAACCGCATAAA	CAAGGACTCATAGATTGCCGAA	95
<i>hsp18</i>	heat shock protein	CGGTATCAGGAGTTTGTGATTTC	CGTAGTAACTCGGGAGTAATTC	102
<i>cfa</i>	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	TGATTATTACGGCTGCTAA	GACCTGTTCTTGGAGATTA	116
<i>accA</i>	acetyl-coenzyme A carboxylase	GATTGGCAACCCCATTTTCGGC	GCTTTTTCAGCGTCCGTTTC	145
<i>accD</i>	acetyl-coenzyme A carboxylase	AGAAATGCTCACTAAGGATG	GAATACCCAGGAAAGGAAA	77
<i>accC</i>	biotin carboxylase	ATAGTGCTGGAAACATCT	CGTTCTGAAGGGTTAATC	109
<i>fabZ</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	TGATTGTTGAAGCACTTG	GGACGAAACCAATTCCTTA	121
<i>accB</i>	biotin carboxyl carrier protein	TCCGATTCTAATGATGAAGTT	GAGAGTTAATAGTCTCGTAT	91
<i>fabF</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	CTCTGTCCAAAGCAACTG	CTCCTTCTCCCATCACAA	81
<i>fabG</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	AGTTTAAATGTCACTCAGCCG	GCTTTACTGGCAGCGTAAT	128
<i>fabD</i>	acyl-carrier-protein S-malonyltransferase	AGACTCTCAGCAAAACAATG	CAACAGAAATCAACACCAAGA	84
<i>fabK</i>	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase II	AGTTGAAGAATTAGGCAATG	CCGTAACTCCCAAGTAAT	171
<i>acpP</i>	acyl carrier protein	AAATCACTATGACCACAAAT	CTTTAGCGTTAGCCAATT	174
<i>fabH</i>	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	TTATTACTGGATGAATGGTTAC	ATACTGTAGACTATGCTTCC	108
<i>marR</i>	transcriptional regulator	ATCTTTCCACCGACAAATG	GCAGCGAATGTTCAATAATG	80
<i>fabM</i>	3R-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	GGGACGAAAAGACGAAAA	TTAGGCGATTAAAGGATCAAA	90

X.3.2 PCR en temps réel

Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées selon Desroche *et al.* (2005). Pour chaque gène étudié et chaque condition, des dilutions au $\frac{1}{4}$ et en cascade des ADNc ont été effectuées. Afin d'être amplifiées, ces matrices ont été placées à un mélange réactionnel contenant le SYBR[®] Green (Go Taq[®] qPCR Master Mix, Invitrogen, France) et les amorces (0,72 μ M). Un témoin négatif a été réalisé avec de l'eau ultra pure alors que l'ADN génomique constituait le témoin positif.

L'amplification a été réalisée dans des plaques de 96 puits à l'aide d'un appareil CFX96[™] Real-time system (BioRad, France). Les différents cycles utilisés étaient les suivants : dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min, suivie de 38 cycles à 95°C pendant 15 s puis 30 s à 60°C. Une étape supplémentaire avec un gradient thermique allant de 90 à 60°C (0,05°C.s⁻¹) a été utilisée pour tracer une courbe de fusion (Figure 45). Pour chaque condition, un cycle seuil ou C_T (threshold cycle) a été déterminé avec une ligne de base placée à 100 unités relatives de fluorescence (RFU) (Figure 45). Le C_T définit le nombre de cycles nécessaires pour détecter le premier signal fluorescent émis par le SYBR[®] Green qui est statistiquement différent du bruit de fond.

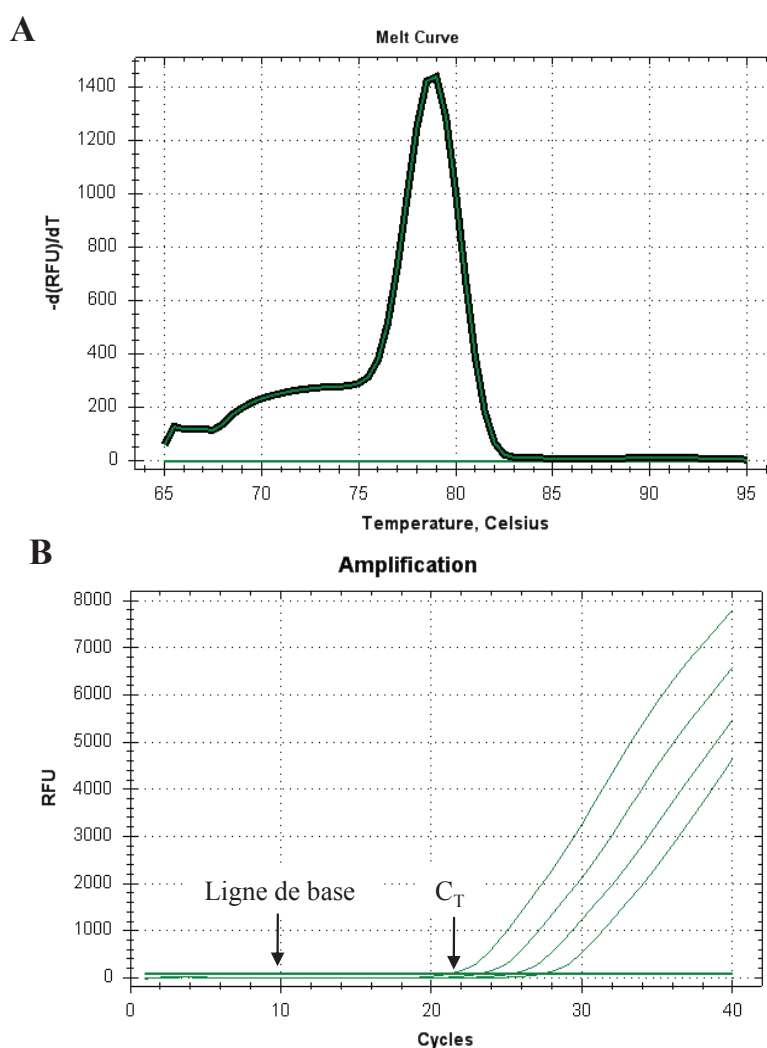


Figure 45 : Exemple de résultats obtenus par qPCR : (A) courbe de fusion, (B) détermination de C_T .

Les résultats ont ensuite été analysés en utilisant la méthode comparative des cycles seuils ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Cette méthode permet de normaliser le taux de transcrits synthétisés en conditions de stress par rapport à un standard : le taux de transcrits relatif est alors ramené à 1. Pour notre étude, une condition de référence (phase exponentielle en conditions optimales de croissance) et 2 gènes de référence ont été utilisés : *ldhD* et *gyrA* qui codent respectivement pour la D-lactate déshydrogénase intervenant dans les voies de catabolisme des sucres et la sous-unité A de la gyrase impliquée dans la réplication de l'ADN. Ces gènes ont été choisis car leur quantité de transcrits varient très peu lors de différentes conditions physiologiques testées (Desroche *et al.*, 2005). Pour chaque condition, les expériences ont été réalisées à partir des ADNc provenant de 3 cultures indépendantes. Les gènes qui possèdent une expression relative 2 fois inférieure ou 2 fois supérieure à la condition témoin sont considérés, respectivement, comme réprimés ou surexprimés.

RESULTATS

I. Caractérisation de la relation structures - fonctions de la protéine Lo18

I.1. Introduction

Afin de s'adapter aux conditions environnementales dans lesquelles ils se développent, la plupart des microorganismes sont capables d'activer des mécanismes de réponse au stress parmi lesquels la synthèse de protéines de stress occupe une place très importante. Parmi ces protéines de stress, on retrouve notamment les sHsp. Ces protéines possèdent une activité de protection des protéines cytoplasmiques (activité chaperon) et pour certaines d'entre elles une activité de stabilisation des membranes cellulaires (activité lipochaperon) est observée (Basha *et al.*, 2011; Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002). Ces deux types d'activité ont été démontrées pour la sHsp Lo18 de *O. oeni* aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Weidmann *et al.*, 2010). De plus, la littérature décrit que l'oligomérisation des sHsp est cruciale pour leurs fonctions (Balogi *et al.*, 2008; Bova *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Sun & MacRae, 2005a). Cependant, à l'heure actuelle, le lien existant entre la structure et les activités de la protéine de stress Lo18 de *Oenococcus oeni* reste à préciser.

Afin de caractériser cette relation entre la structure et les fonctions de Lo18, une étude *in vitro* a été réalisée. Dans un premier temps, nous avons généré différentes formes oligomériques de Lo18 grâce à la modification des conditions physicochimiques (pH 5 à 9). Le mélange de structures quaternaires a été analysé par filtration sur gel et par ultracentrifugation analytique (collaboration avec l'IBS de Grenoble : C. Ebel, A. Appourchaud, J. Covès). Ces techniques ont montré que Lo18 s'organise sous forme d'un mélange d'oligomères qui se dissocie en dimères lors d'une augmentation du pH. Cette structure oligomérique apparaît comme étant l'unité de base nécessaire à l'oligomérisation de Lo18. Une collaboration avec l'IBS de Grenoble (D. Fenel, G. Schoehn, J. Covès) nous a permis de déterminer la structure tridimensionnelle adoptée par Lo18 à pH acide par microscopie électronique. Les images à basse résolution obtenues indiquent que Lo18 s'organise en un 16-mère composé de deux anneaux dont les domaines α -cristallin se superposent à 81% avec ceux de la structure cristallographique de Hsp16.5 synthétisée par *Methanococcus jannaschii*. Sur la base de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalité de Lo18. Des mesures d'activité chaperon et lipochaperon *in vitro* ont été réalisées pour chacun des pH testés. Cette étude structures - fonctions a révélé un fort lien entre la dynamique d'oligomérisation et les activités de cette sHsp. La structure et les fonctions de trois protéines Lo18 modifiées au niveau d'un acide aminé ont également été étudiées afin d'évaluer l'impact de ces mutations ponctuelles. Les résultats obtenus sont présentés dans cette partie sous forme d'un article publié et de résultats complémentaires.

1.2. Article I

Title: The oligomer plasticity of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection.

Short title: Lo18 activities are dependent on oligomer plasticity.

Authors: Magali MAITRE¹, Stéphanie WEIDMANN^{1*}, Aurélie RIEU¹, Daphna FENEL², Guy SCHOEHN^{2,3}, Christine EBEL², Jacques COVES^{2*} and Jean GUZZO¹.

¹ UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex, France,

² Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS - CEA- UJF-Grenoble-1, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France,

³ Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex, France.

Corresponding authors : Stéphanie Weidmann, UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, F-21078 Dijon Cedex, France; tel: + 33 3 80 39 62 62; fax: + 33 3 80 39 62 63; e-mail: stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr or Jacques Covès, Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS - CEA- UJF-Grenoble-1, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble Cedex, France; tel: +33 4 38 78 24 03; fax: + 33 4 38 78 54 94; e-mail: jacques.coves@ibs.fr.

Keywords: chaperone activity, lactic acid bacterium, membrane stabilization, oligomerization, small heat shock protein (sHsp).

Article publié dans Biochemical Journal en 2012, volume 444, pages 97-104.

The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection

Magali MAITRE*, Stéphanie WEIDMANN*¹, Aurélie RIEU*, Daphna FENEL†, Guy SCHOEHN†‡, Christine EBEL†, Jacques COVES†¹ and Jean GUZZO*

*UMR PAM-équipe VALMIS, IUUV, 1, rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex, France, †Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF-Grenoble-1, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France, and ‡Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex, France

The ability of the small Hsp (heat-shock protein) Lo18 from *Oenococcus oeni* to modulate the membrane fluidity of liposomes or to reduce the thermal aggregation of proteins was studied as a function of the pH in the range 5–9. We have determined by size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation that Lo18 assembles essentially as a 16-mer at acidic pH. Its quaternary structure evolves to a mixture of lower molecular mass oligomers probably in dynamic equilibrium when the pH increases. The best Lo18 activities are observed at pH 7 when the particle distribution contains a major proportion of dodecamers. At basic pH, particles corresponding to a dimer prevail and are thought to be the building blocks leading to oligomerization

of Lo18. At acidic pH, the dimers are organized in a double-ring of stacked octamers to form the 16-mer as shown by the low-resolution structure determined by electron microscopy. Experiments performed with a modified protein (A123S) shown to preferentially form dimers confirm these results. The α -crystallin domain of *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5, taken as a model of the Lo18 counterpart, fits with the electron microscopy envelope of Lo18.

Key words: chaperone activity, lactic acid bacterium, membrane stabilization, oligomerization, small heat-shock protein (sHsp).

INTRODUCTION

Bacteria use several mechanisms including sHsp [small Hsp (heat-shock protein)] synthesis to cope with environmental stress [1]. All proteins of the sHsp family exhibit a low molecular mass ranging from 12 kDa to 43 kDa and contain an α -crystallin domain of 80–100 residues flanked by a N-terminal region of variable sequence and a short C-terminal region [2,3]. Synthesis of sHsp is up-regulated in response to various signals and more generally in response to protein aggregation. sHsp functions have been investigated both *in vivo* and *in vitro*. Their chaperone activity was demonstrated *in vivo* by evaluating the thermostabilization of cellular proteins in *Escherichia coli* cells expressing either rice cells Oshsp 16.9 (*Oryza sativa* Hsp16.9) or the sHsp Lo18 from *Oenococcus oeni* [4,5]. In some cases, *E. coli* expressing Oshsp16.9 or sHsp from *Pyrococcus furiosus* exhibited an enhanced thermotolerance [4,6]. *In vitro*, sHsps are known to exert a molecular chaperone activity on various protein substrates [7] by interacting with the proteins and preventing aggregation during heat shock [8]. The organization of sHsps in large oligomers is critical for their activity [2,9]. Besides, as reflected by a rapid subunit exchange under physiological conditions to form homo- or hetero-oligomers [10], their quaternary structure is highly dynamic [3,11]. The effect of temperature, pH and protein concentration has been demonstrated to be critical for oligomerization and consequently for chaperone activities [12,13].

Some sHsps were also found to have a stabilizing effect on membrane lipids [14]. For instance, SP21 from *Stigmatella aurantiaca* could participate to the stabilization of cellular com-

ponents during stress and to the extensive reconstruction activities accompanying spore formation [15]. In yeast, Hsp12 was found to protect liposomal membrane integrity against desiccation and ethanol-induced stress [16]. The capacity to stabilize membrane has been extensively described for Hsp17 from *Synechocystis* PCC 6803 on liposome models with various compositions of fatty acids [14,17]. However, whereas oligomerization is a pre-requisite for *in vitro* chaperone activity preventing aggregation of proteins [3,18], the quaternary structure of sHsp during interaction with membrane lipids is less documented. Nevertheless, it is known that the association of Hsp17 with membranes is dependent on the oligomer dissociation [19].

O. oeni is a lactic acid bacterium mostly responsible for malolactic fermentation in wine [20]. However wine must be considered as a hostile environment for cell growth, characterized by a low pH, the presence of 10–13% ethanol, high sulfite concentration, low temperature and nutrient starvation. *O. oeni* has evolved adaptation strategies to cope with this harsh environment such as: (i) modifications of membrane composition by changing the proportion of saturated, unsaturated, cyclic or branched fatty acids to adjust membrane fluidity [21] or (ii) synthesis of stress proteins [22,23]. We previously investigated the heat-shock response of *O. oeni* [22] with a special emphasis on the role of Lo18 [24]. The transcription of the *hsp18* structural gene was induced after addition of benzyl alcohol, a membrane fluidizer, and in response to this stress, the corresponding protein Lo18, was found associated to the membrane [25]. The synthesis of Lo18 is induced also during the stationary growth phase [26,27]. Lo18 was demonstrated to protect *in vitro* both currently used protein models from aggregation and liposomes formed with

Abbreviations used: AUC, analytical ultracentrifugation; CS, citrate synthase; DPH, diphenylhexatriene; Hsp, heat-shock protein; LB, Luria–Bertani; Oshsp 16.9, *Oryza sativa* Hsp16.9; R_g , Stokes radius; SEC, size-exclusion chromatography; sHsp, small Hsp.

¹ Correspondence may be addressed to either of these authors (stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr or jacques.coves@ibs.fr).

O. oeni lipids from destabilization [24,25]. We also provided evidence for a role of different amino acids of the α -crystallin domain in such *in vivo* activities [5].

In the present study, we have assayed the chaperone activity of the wild-type Lo18 and that of Lo18 modified in the α -crystallin domain by the A123S substitution, as a function of the pH. These activities were correlated with the dynamic behaviour of the quaternary structure of Lo18 explored at the different pH. The low-resolution structure of the wild-type protein was determined by electron microscopy at pH 5, a pH at which Lo18 is present as large oligomers that are probably inactive. Finally, we investigated the activity of Lo18 in membrane stabilization as a function of its subunit organization. Our data strongly argue for a dimer as the basic structure for oligomerization and consequently Lo18 activity.

EXPERIMENTAL

Bacterial strains and plasmids

O. oeni ATCC BAA-1163 (formerly known as IOB 8413) was grown at 30°C and at pH 5.3 in FT80 medium modified by the addition of meat extract instead of casamino acids (mFT80 medium) [28]. *E. coli* BL21 star (DE3) cells transformed with the plasmids pET28a-hsp18 or pET28a-A123S, named respectively *E. coli* Lo18 and *E. coli* A123S [5], were grown aerobically at 37°C in LB (Luria–Bertani) broth supplemented with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin.

Protein expression and purification

The *E. coli* strains Lo18 and A123S were used for overexpressing wild-type Lo18 and the modified form A123S, respectively [5]. Cell-free extracts were prepared from a 1 litre culture of *E. coli* cells grown aerobically at 37°C in LB medium supplemented with kanamycin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The production of Lo18 or A123S was induced by adding 50 μM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37°C and shaking. All procedures were then carried out at 4°C. Cells were washed in 20 mM Tris/HCl and 250 mM NaCl (pH 8), concentrated by centrifugation (at 7500 g for 5 min) and disrupted at 1.4 kbar (140 000 kPa) (Disruptor Z Plus Series Cell, Constant Systems Ltd). The suspension was centrifuged at 7500 g for 20 min at 4°C to remove unbroken cells. The supernatant was filtered on 0.2 μm -pore-size membrane and loaded on to a HIC-PHE 1 ml column (GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris/HCl and 250 mM NaCl (pH 8). The protein was eluted with 20 mM Tris/HCl (pH 8) buffer and dialysed against 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) [25]. Purified proteins were concentrated at 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and stored at -20°C in the same buffer.

SEC (size-exclusion chromatography)

The oligomeric state of purified Lo18 and A123S was estimated by SEC on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare). Before each run, the column was equilibrated with 50 mM phosphate buffer at pH 5, 6, 7, 8 or 9. Proteins (300 μg) were injected and separated at a flow rate of 0.5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ at 10°C using an Akta Purifier device (GE Healthcare). Absorbance was recorded at 215 nm and 280 nm and 1 ml fractions were collected and analysed by SDS/PAGE (12% gel). For calibration, ovalbumin [43 kDa, R_s (Stokes radius) = 30.5 Å (1 Å = 0.1 nm)], conalbumin [75 kDa, R_s = NA (not applicable)], aldolase (158 kDa, R_s = 48.1 Å), ferritin (440 kDa, R_s = 61.0 Å) and thyroglobulin (669 kDa, R_s = 85.0 Å) were used. Each experiment was performed in triplicate.

AUC (analytical ultracentrifugation)

Sedimentation velocity experiments were performed using a Beckman XL-I analytical ultracentrifuge and an AN-50 TI rotor (Beckman Coulter). The experiments were carried out at 20°C in buffer containing 50 mM sodium phosphate, pH 5, 6, 7, 8 or 9. Protein concentrations were 13 μM , 34 μM and 68 μM for Lo18 and A123S corresponding to an absorbance at 280 nm of 0.2, 0.5 and 1 respectively. A volume of approximately 400 μl was loaded into 12 mm path-length two-channel cells equipped with sapphire windows. Buffer without protein was loaded in the reference channel. Sedimentation profiles were recorded overnight at 50 000 rev./min every 12 min, at 275 nm and by interference. Data were analysed with the program Sedfit (available at <http://www.analyticalultracentrifugation.com>) using the continuous distribution of sedimentation coefficients [$c(s)$] analysis [29]. We used the Sednterp software (freely available at <http://www.jphilo.mailway.com>) to estimate the partial specific volume of the polypeptide chain ($\bar{v}_{\text{Lo18}} = 0.7205 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ and $\bar{v}_{\text{A123S}} = 0.7199 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$), the solvent density ($\rho = 1.004 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and the solvent viscosity ($\eta = 1.023 \text{ cP}$) at 20°C, for the $c(s)$ analysis and calculation of the corrected s_{20w} values. The $c(s)$ curves were obtained considering 200 particles with sedimentation coefficients (s) between 0.1 and 20 S, with a frictional ratio, f/f_{min} , of 1.25 corresponding to a globular compact macromolecule. A confidence level of 0.68 was assumed.

The sedimentation coefficients, were analysed using the Svedberg equation, in terms of the molecular mass, M , considering the R_s obtained from SEC: $s = M \cdot (1 - \bar{v} \rho) / (NA \cdot 6\pi \eta R_s)$. The ratio of R_s to the minimum theoretical hydrodynamic radius of non-hydrated volume of the particle defines the frictional ratio f/f_{min} , related to the macromolecule hydration and shape.

Electron microscopy

Before negative staining, samples prepared for AUC were diluted at 3 μM (around 0.05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in a phosphate buffer at the desired pH. An aliquot (4 μl) of these protein samples were adsorbed on to the clean face of a carbon film on a mica sheet (carbon/mica interface) and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate. Micrographs were taken under low-dose conditions with a FEI CM12 LaB6 electron microscope working at 120 kV and with a nominal magnification of 45000 $\times$ using an Orius SC1000 GATAN CCD camera (1.55 Å/pixel at the specimen level). The image analysis procedure was started by selecting 800 particles in 128 $\times$ 128 pixel squares from 12 micrographs (sample at pH 5) by using X3D [30]. A starting model was created using one centred raw image that showed a clear circular symmetry. This single image was used to generate an initial three-dimensional starting model and to run a projection matching procedure as described in [31]. After 20 cycles of refinement because of the D8 symmetry appearance (two 8-fold symmetry rings stacked together through a 2-fold axis) of the three-dimensional reconstruction and because the reprojections of the three-dimensional structure fitted well with the raw images, we imposed full D8 symmetry to the reconstruction. A further 25 cycles of refinement was performed using 29 reprojections, and only 25% (190) of the images that had the highest correlation coefficient with the reprojection of the model were included in the reconstruction. Because of the low number of images used in the three-dimensional reconstruction, the resolution of the final model was limited to 30 Å. No contrast transfer function correction was applied. For the isosurface representation, we included the correct molecular mass of the complex (16-mer) using an average protein density of 0.84 $\text{Da}\cdot\text{Å}^{-3}$. The crystal

structure of the *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5 monomer (PDB code 1SHS) was docked into the electron microscopy density map of Lo18 with VEDA (<http://mem.ibs.fr/VEDA>). The resolution of the fit was limited to 25 Å. The Hsp16.5-based model fitted into the electron microscopy density with a correlation of 81 %.

Thermal aggregation of CS (citrate synthase)

An ammonium sulfate suspension of CS (Sigma) was dialysed against TE buffer [50 mM Tris/HCl and 2 mM EDTA (pH 8)] and concentrated to about 17 mg·ml⁻¹ at 4°C. CS was then centrifuged at 14000 rev./min during 30 min at 4°C to remove precipitated protein. The exact concentration in supernatant was determined and aliquots of 30 µM CS (monomer) were prepared and stored at -20°C. CS at a concentration of 300 nM was thermally denatured in 50 mM phosphate buffer, pH 5, 6, 7, 8 or 9, at 45°C in the absence or presence of 1.2 µM, 4.8 µM or 9.6 µM Lo18 or A123S. CS aggregation was analysed by light scattering at 360 nm using a Uvicon XS70 spectrophotometer equipped with a Peltier thermosystem (Secoman, Bioserv). Each experiment was performed in triplicate. Lysozyme (1.2, 4.8 or 9.6 µM) was used as negative control.

Preparation of liposomes

O. oeni cells {50 UA (absorbance units) [1 UA = 2 × 10⁸ CFU (colony-forming units)·ml⁻¹]} collected in exponential growth phase were used to extract cellular lipids according to [32]. Liposomes were obtained as described previously [25] with slight modifications. A film of extracted lipids was obtained by evaporation of chloroform using a rotavapor at 65°C (Rotary Evaporator RE100 Bibby, Odil) under nitrogen-reduced pressure followed by rehydration with pre-warmed 50 mM phosphate buffer pH 5–9 at 65°C. The liposome suspension was gently mixed and sonicated for 2 × 30 s (ELMA D-78224, VWR). Liposomes were stored at 4°C for a maximum of 1 week.

Fluidity measurements

Fluorescence anisotropy was measured in a cuvette filled with 250 µl of liposomes prepared as described above, containing an additional 3 µM DPH (diphenylhexatriene) probe (Molecular Probes) and in the absence or the presence of 10 µM purified Lo18 or A123S. Lysozyme (10 µM) was used as a negative control. Measurements were performed for 30 min (1 determination every 8 s). After probe insertion (10 min at 15°C), a linear gradient of temperature from 15 to 65°C (increase of 2°C per min) controlled by a Peltier system (Wavelength Electronics) was applied to the liposome suspension. Anisotropy measurements were carried out using a Fluorolog 3 spectrofluorimeter (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon) and anisotropy values were calculated according to [33]. Excitation and emission wavelengths were 352 nm and 402 nm respectively. Each experiment was done in triplicate.

Statistical analysis

One-way ANOVA was carried out using SIGMASTAT® v. 3.0.1 software (SPSS). The Holm–Sidak test ($n = 3$, $P < 0.05$) was performed to find significant differences.

RESULTS

Effect of pH on the chaperone activity of Lo18 and A123S

The chaperone activity of Lo18 was checked *in vitro* by assaying its ability to protect the CS from thermal aggregation [24] as a function of the pH in the range 5–9. Chaperone activity of

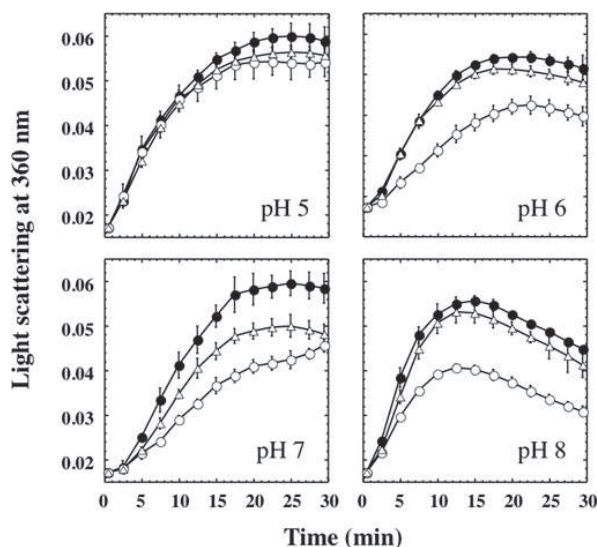


Figure 1 Chaperone activity of Lo18 or A123S in the pH range 5–8

The light scattering at 360 nm corresponding to thermal aggregation of 300 nM CS at 45°C was recorded as a function of time and pH in the absence (●) or the presence of 9.6 µM of either Lo18 (○) or A123S (△). Averages and error bars (S.D.) are calculated from the results of three independent measurements.

Lo18 and A123S at a concentration of 9.6 µM was reported in Figure 1 in the range of pH 5–8 only, because at pH 9 the very high CS aggregation velocity prevents accurate measurements (results not shown). When heated at 45°C, CS began to form insoluble aggregates that could be detected by recording the increase in light scattering at 360 nm (Figure 1, ●). Lo18 (Figure 1, ○) poorly protects CS from thermal aggregation at pH 5, whereas the best thermal aggregation reduction was detected at pH 6 and 7. Lo18 remains active at pH 8 even if the activity was difficult to assess accurately due to the high CS aggregation velocity observed at this pH, which may hamper the effect of Lo18. When the same experiments were performed with A123S (Figure 1, △), a significant chaperone activity was detected only at pH 7. The chaperone activity of Lo18 in the concentration range 1.2–9.6 µM was also assayed and found to be dependent on the protein concentration, as reported previously [24]. The same is true for A123S with the maximal activity obtained at 4.8 µM (results not shown). Finally, negative controls run in the presence of lysozyme, a protein without any known chaperone activity, gave results similar to those of the blanks without protein (results not shown).

The quaternary structure of sHsp Lo18 is dependent on the pH

The quaternary structure of Lo18 was first analysed by SEC as a function of pH in the range 5–9 (Figure 2A). Lo18 eluted as a more or less symmetrical broad peak regardless of the pH value, suggesting a mixture of species. At pH 5, 6 and 7, the elution volume of 11.5 ml for the main peak allows to estimate the presence of oligomers of $R_s = 60 \pm 2$ Å, thus approximately 300 kDa, corresponding roughly to 17 or 18 subunits, considering a precise molecular mass of 16938 Da for the Lo18 monomer and a globular shape. The peak at pH 6 is the broader, suggesting a higher size heterogeneity. The peak at pH 7 shows an extra feature around 14 ml, i.e. a Stokes radius of 57 ± 2 Å suggesting

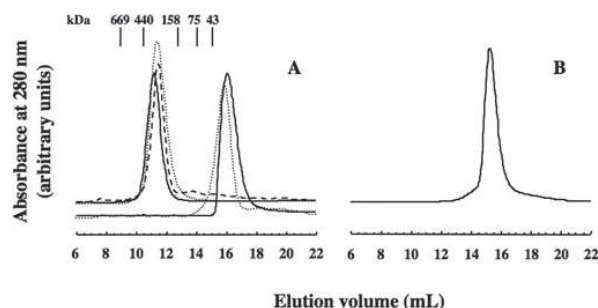


Figure 2 SEC of Lo18 and A123S

(A) Lo18 was loaded on to a Superdex 200 10/300 GL column equilibrated in phosphate buffer at pH 5 (continuous line, high molecular mass), pH 6 (dotted line, high molecular mass), pH 7 (dashed line, high molecular mass), pH 8 (solid line, low molecular mass), pH 9 (dotted line, low molecular mass). For clarity, the chromatograms at pH 8 and 9 are represented with a different baseline. (B) Elution of A123S at pH 7. Results of the column calibration are displayed in (A).

the presence of lower molecular mass species in this sample. The elution profile is dramatically different at pH 8 and 9 with peaks eluting around 16 ml corresponding to 24 ± 4 Å. This is the expected volume for the elution of the dimeric compact form of Lo18.

Oligomerization of Lo18 between pH 5 and 9 was further investigated by AUC at three protein concentrations (13 μ M, 34 μ M and 68 μ M). Examples of raw data and their fits for Lo18 at 68 μ M at pH 5 and 9, and superimpositions of the distribution of sedimentation coefficients for Lo18 at 68 and 13 μ M at various pH values are shown in Supplementary Figure S1 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/444/bj4440097add.htm>). Figure 3 reports the main features in a peak-by-peak analysis. A main species was observed at pH 5 and 6 at around 12 S ($s_{20,w} = 12.4$ S). Considering a globular shape ($f/f_{\min}$ value of 1.25), the s -value corresponds to a 16-mer, which represented approximately

90% of the species. Combining the s -values with the Stokes values estimated by SEC gives a slightly larger number of 17–18 subunits, in an oligomer with a more extended shape ($f/f_{\min} = 1.33$). The measurements do not allow discriminating accurately between the two association states. These samples contained also 8–10% of the heaviest particles with s -values around 15 S, which could correspond to assemblies of 21 ± 1 subunits considering a globular shape. A minor species of about 1.5 S (>3%) that may correspond to an elongated monomer is also present. At pH 7 and above, the sedimentation profiles analysis revealed an increasing heterogeneity. The main particles at pH 7 representing 50–75% of the population were at 10.8 ± 0.2 S ($s_{20,w} = 11.2$ S). The $c(s)$ distributions show also 15–20% of an intermediate species in the range 6–7 S and 15% of small species at around 2–2.5 S. Their presence is emphasized at pH 8 and 9, where the analysis revealed several peaks poorly resolved. Considering a mixture of discrete species in solution, the combination of the main peaks at pH 7, $s = 10.8$ S, with a R_s of 57 ± 2 Å determined by SEC, allows us to estimate the presence of particles of ~ 12 –15 subunits. Globular tetramers and hexamers are calculated to sediment at 4.8 and 6.3 respectively. On the other hand, the smallest species at 2.6 ± 0.2 S ($s_{20,w} = 2.9$ S) is rather well defined and probably corresponds to a dimer. It contributes to $\sim 25\%$ of the whole species at pH 8 and 9. At pH 7–9, the population was also completed with the presence of 5–10% of oligomers larger than 20-mers. The assignment of the oligomeric species determined by AUC fits pretty well with that deduced from SEC. However their distribution does not reveal any correlation with the protein concentration, in the range used during the present study.

A123S displays a chaperone activity at pH 7, where this protein behaves as a dimer both by SEC (Figure 2B) with an elution volume around 16 ml and by AUC experiments (Figure 3) with the main peak at 2.7–3 S representing 60–70% of the particles and assumed to correspond to a dimer. An extra peak with a sedimentation coefficient of 6–6.5 S related to the presence of a putative hexamer was also detected. These results are in agreement

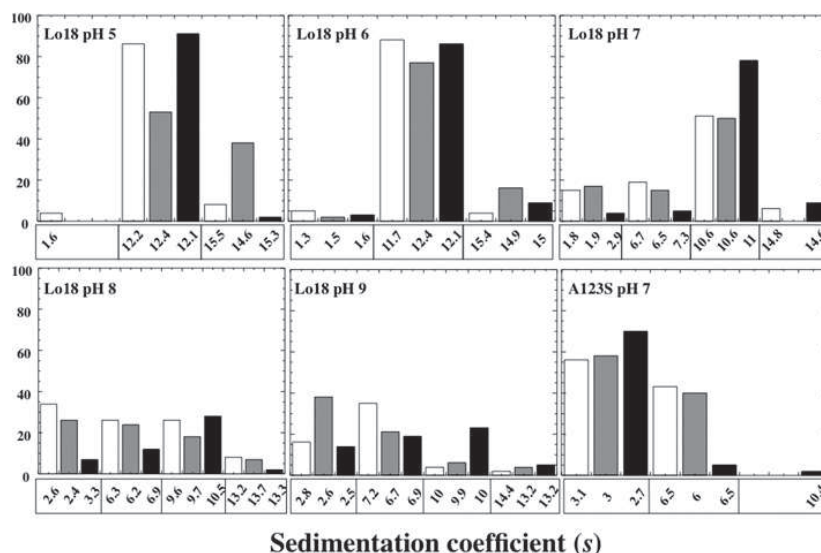


Figure 3 Distribution of the sedimentation coefficient as a function of pH for Lo18 and A123S

AUC experiments were performed at three protein concentrations: 13 μ M (white columns), 34 μ M (grey columns) and 68 μ M (black columns). At each concentration, different populations of sedimentation coefficients (frames in abscissa) corresponding to different oligomeric forms were identified.

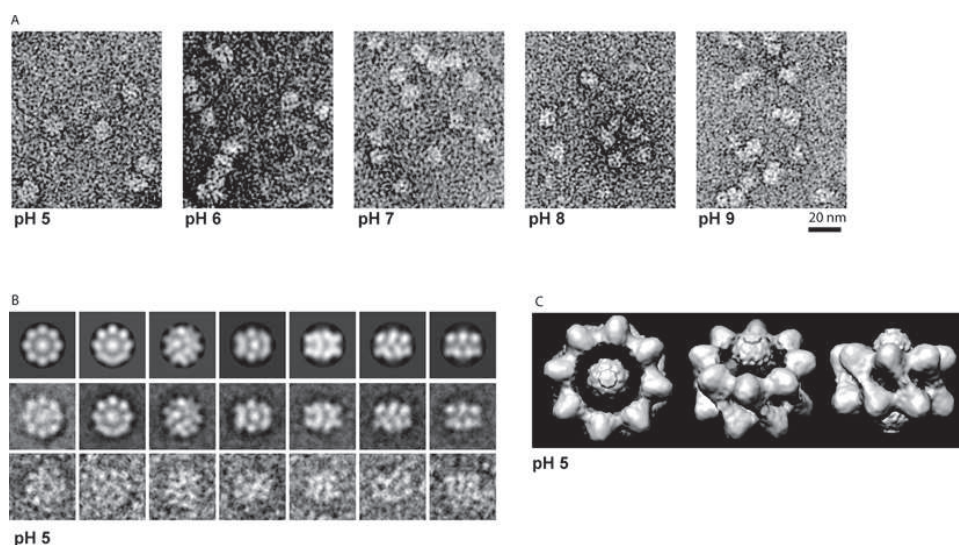


Figure 4 Electron microscopy of Lo18

(A) Negative-staining images of Lo18 at different pH values (stained with uranyl acetate). (B and C) Image analysis for the pH 5 sample. (B) Reprojections of the three-dimensional structure of Lo18 (top row) compared with the corresponding class averages used to calculate the three-dimensional reconstruction (middle row) and with some corresponding raw images (bottom row). The size of each square is $200 \text{ Å} \times 200 \text{ Å}$. (C) Three-dimensional structure of Lo18 at about 30 Å resolution viewed in top view down the 8-fold axis (left-hand panel), slightly tilted (middle panel) and in side view down a 2-fold axis (right-hand panel).

with those obtained by *in vivo* cross-linking experiments where the presence of dimers and few oligomers was observed [5]. This confirms that A123S is impaired in its capacity to form large oligomers.

Electron microscopy was used to observe directly the oligomeric complexes formed by Lo18 at different pH values after negative staining (Figure 4A). The sample appeared as quite well-structured spherical oligomers with few aggregates at pH 5 and pH 6. From pH 7–9, several aggregates were observed and Lo18 appeared less structured and more heterogeneous in size, preventing image analysis. The pH 5 samples which appear to be the more homogenous ones were subjected to image analysis. The three-dimensional model we obtained is a rather low-resolution model (30 Å), but it shows the general organization of the complex: a doughnut-like structure made by two stacked rings with eight monomers per ring (Figures 4B and 4C). The dimer that is probably the building block of the complex can be identified on the side view. The two vertices of the structure are occupied by a non well-defined density. It is unlikely that this density can be assigned to extra copies of the chaperone which did not follow the imposed symmetry. The possibility that the N-terminal region flanking the α -crystallin domain is involved in such a density will be discussed. By visual inspection of the images, it is clear that there is quite a high heterogeneity in the sample: only 25 % of the starting images have been used and probably other structures can co-exist with the 16-mer. It should be noticed that the size distribution can be different between electron microscopy and AUC since the protein concentration used in negative staining is approximately five times lower than the lowest one used in AUC.

Relation between pH and liposome stabilization by Lo18 and A123S

Liposomes formed by lipids extracted from *O. oeni* cells collected during exponential growth were mixed with DPH. The variation of membrane fluidity was then measured at pH values varying from

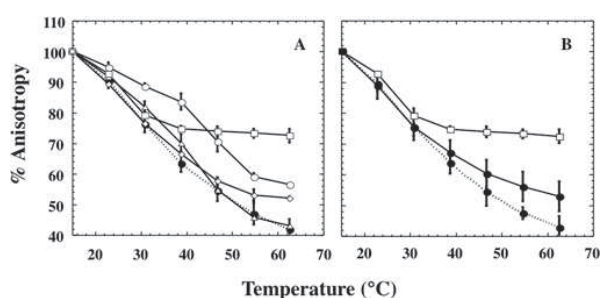


Figure 5 Evolution of liposome fluidity

(A) Results are expressed as anisotropy percentage as a function of the temperature increase in the absence of protein (●, broken line) or in the presence of $10 \mu\text{M}$ Lo18 at different pH values: 5 (○), 6 (△), 7 (□) and 8 (◇). (B) The same experiment was reproduced in the presence of $10 \mu\text{M}$ A123S at pH 7 (●, solid line). The curves obtained without protein (●, broken line) and in the presence of Lo18 at pH 7 (□) were purposely reproduced. The initial anisotropy value (100 %) was equal to 0.167 ± 0.08 .

5 to 8 by steady-state fluorescence anisotropy of DPH during temperature ramping ($15\text{--}65^\circ\text{C}$), in the absence or presence of Lo18 (Figure 5A). The gradual decrease of the anisotropy values reflected the liposomes fluidizing due to temperature increase and reached 42 % of the initial value at 65°C regardless of the pH in the absence of Lo18. The same results were obtained in presence of lysozyme used as a negative control (results not shown). It is important to point out that the curves displayed in Figure 5 are directly comparable in the absence of Lo18 since the kinetics of liposome fluidizing appeared to be independent of the pH. As for the chaperone activity, the best stabilization effect of membrane fluidity was obtained at pH 7. Below 31°C , there was no significant effect of the presence of Lo18 on the order of membrane lipids, but above this temperature the increase in acyl chain motion caused by the increase in temperature was

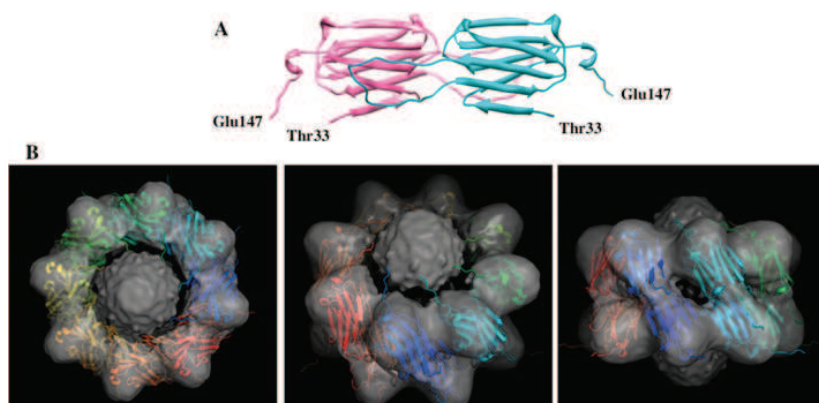


Figure 6 Fitting of the pseudo atomic model of a *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5 subunit pair in the three-dimensional reconstruction of Lo18

(A) Ribbon view of the Hsp16.5 dimer used in the superposition (PDB code 1SHS). The N- and C-terminus in each protomer are indicated. Note that the N-terminal 32 residues are highly disordered and not structurally defined. (B) Eight Hsp16.5 dimers were docked within the electron microscopy map of Lo18 with the help of the VEDA software (<http://mem.ibs.fr/VEDA>). Top view down the 8-fold axis (left-hand panel), slightly tilted (middle panel) and in side view down a 2-fold axis (right-hand panel).

significantly reduced. The membrane fluidity that represented 79 % of the initial value at 31 °C decreased only to 73 % at 65 °C. When the experiment was performed at pH 8, no significant effect of the presence of Lo18 was observed until 55 °C and a very slight, but significant, effect ($P < 0.05$) was discernable between 55 °C and 65 °C. The situation was different at acidic pH. Until 39 °C at pH 5, the reduction of liposome fluidity was better than that obtained at pH 7 (84 % compared with 79 %). However, above this temperature, the fluidizing of the liposomes strongly increased and reached 57 % of the initial value at 65 °C, compared with 73 % at pH 7. The same atypical profile was observed at pH 6, although to a lower extent. The presence of Lo18 had a significant effect on liposome stabilization between 23 °C and 47 °C. Above this temperature, the anisotropy values decreased and the level of fluidity obtained (43 % of the initial fluidity) was not significantly different from that obtained with liposomes alone.

The evolution of the liposomes fluidity was also assayed in the presence of A123S at pH 7 (Figure 5B). A slight protective effect was discernable until 35 °C and the presence of the modified protein produced significant protection above 55 °C, even though it remained modest.

DISCUSSION

As the growth of *O. oeni* is crucial for malolactic fermentation in wine, a further characterization of Lo18 that was demonstrated to actively participate to *O. oeni* adaptation to wine is of particular interest. In the present study, we provide strong evidence for a relationship between the dynamic oligomerization of Lo18 and its role in membrane stabilization and protein protection. The oligomeric status of Lo18 was explored as a function of pH in the range 5–9. The AUC data confirmed the results of SEC experiments indicating that Lo18 formed heavy oligomers between pH 5 and 7, but was no longer able to maintain this association at higher pH values. The main species representing approximately 90 % of the population corresponds to 16-subunit oligomers at pH 5 and 6, and probably evolves to 12-subunit oligomers representing more than half of the species at pH 7. Increasing the pH above pH 7 leads to an increased heterogeneity of the samples with the appearance of low-

molecular-mass species. Well-structured spherical oligomers appropriate for image analysis were present at pH 5. The same oligomers are also present at pH 6 when Lo18 gains a significant chaperone activity. This pH corresponds to the intracellular one when *O. oeni* is grown in acidic medium in the presence of L-malate [34]. As determined by electron microscopy, Lo18 appears at pH 5 as an assembly of two stacked rings of octamers, forming the 16-mer detected by AUC. Interestingly, the X-ray structure of the Hsp16.5 dimer from *M. jannaschii* fits pretty well (correlation coefficient >81 %) with the three-dimensional electron microscopy envelope (Figure 6B). The eight monomers of each ring of Lo18 can accommodate each the α -crystallin domain of a Hsp16.5 monomer. *M. jannaschii* Hsp16.5 is the only prokaryotic sHsp for which an X-ray structure was determined [35]. It appears perfectly suited for such a superposition. Hsp16.5 and Lo18 share 54 % of sequence similarity in their α -crystallin domains including 26 % identity (Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/444/bj4440097add.htm>). On the basis of the whole sequence, they share also a very similar secondary structure prediction (Supplementary Figure S2). The ribbon representation of the Hsp16.5 dimer shows that the N-terminal 32 residues are missing (Figure 6A) in the structure. This is consistent with the model of an intrinsically disordered N-terminal arm providing diverse geometries of interaction sites with the client proteins of dodecameric PsHsp18.1 (*Pisum sativum* Hsp18.1) from pea [36]. Besides, the evolutionary variable N-terminal region was also demonstrated to be critical for substrate specificity [36–38]. In the atomic model constructed using the synergistic application of cryo-electron microscopy and EPR [39], the N-terminal sequence of Hsp16.5 was located in the shell formed by the oligomeric structure. One can suggest a similar organization for Lo18 with the N-terminal sequence of each Lo18 protomer pointing towards the centre of the stacked rings in the doughnut-like structure, hence contributing to the two apical densities observed in electron microscopy. The doughnut-like model could represent the inactive structure of a closed molecular cage requiring major structural rearrangements to turn active. The pH-dependent oligomer plasticity of Lo18 illustrates the ability of this protein to be involved in such rearrangements, including the association/dissociation dynamics required for substrate binding in the central core of the protein. Chaperones are thought of as highly sophisticated protein machines that assist the correct

folding of partner molecules by a combination of mechanisms. For instance, the chaperone activity will depend on the accessibility of the hydrophobic surface for its client protein and on a structural rearrangement around it [40]. It appeared that Lo18 with a quaternary structure corresponding to approximately 12-subunit oligomers at pH 7 is suitable for such activities. Actually, if the overall organization of the chaperone is conserved (two stacked rings), the contacts between two adjacent dimers can be quasi-equivalent when comparing hexameric (12-mer) and octameric (16-mer) rings (only the solid angle will change). At pH 5, this protein may either be less able to develop hydrophobic contact with denatured CS or is impaired in conformational adjustments. As expected, the loss of high-molecular-mass particles at basic pH matched with an alteration of chaperone activity. This most probably indicates a decrease in the subunit association constant leading to rapid association/dissociation equilibrium.

It is tempting to speculate that the building block required for Lo18 oligomerization is a dimer, as suggested for the mouse protein Hsp25 [41], *M. jannaschii* Hsp16.5 [35], Hsp16.9 from *Triticum aestivum* [42] or Hsp17 from *Synechocystis* [43]. The structure of dimeric Hsp16.5 matches with the three-dimensional electron microscopy envelope of Lo18, but further arguments for this hypothesis are brought by AUC data that revealed also the presence of low-molecular-mass species that can be assigned to dimeric forms regardless of the pH and the significant chaperone activity of A123S at pH 7. The replacement of Ala¹²³ by a serine residue appeared to be critical for oligomerization of Lo18 and led to the production of a protein characterized as a dimer, both by SEC and AUC experiments. Ala¹²³ localized in a β -sheet of the α -crystallin domain is highly conserved among the proteins of the sHsp family. Its role in formation of oligomers and in chaperone activity was already evidenced in other bacterial sHsps [3,44] or in a truncation mutant of the human α B-crystallin protein [45].

The liposome stabilization activity is dependent on the ability of the protein to interact with the lipids, these interactions being mediated in part by the protein and lipid relative electronic charges. The liposomes formed with phospholipids purified from *O. oeni* cells [25] mimic the bacterial membrane and their phospholipidic composition probably corresponds to that encountered by Lo18 immediately after a heat shock [23]. The pK_a value of the amino group of phosphatidylethanolamine, the most represented phospholipid in *O. oeni* membrane [46], has been estimated to be approximately 9.5 [47] and the theoretical pI of Lo18 is close to 5. This means that electronic interactions between Lo18 and *O. oeni* membrane should be maximal between pH 6 and 8. Actually, the importance of charge interactions between Hsp and lipids has already been pointed out. For instance, a better affinity of GroEL for membrane bilayer was noticed at acidic pH [48]. The authors suggested that the interaction between membrane phospholipids and GroEL was advantaged by hydrophobic residues maybe more exposed to the surface. A strong interaction was also described between negatively charged Hsp16.3 from *Mycobacterium tuberculosis* and positively charged lipids at neutral pH [49]. Besides, the dissociation of sHsp seems to be a prerequisite for the process of association with the membrane as shown for Hsp16.3 [49] or Hsp17 of *Synechocystis* [19]. These behaviours are in agreement with the best liposome stabilization activity of Lo18 observed at pH 7 that allows the best compromise between two crucial criteria: oligomeric status and charge distribution. Finally, dimeric A123S displayed an altered capacity to protect membrane against the deleterious effects of temperature increase compared with Lo18 at pH 7. This suggests that the inability of A123S to be involved in dynamic subunit exchange [50] may be critical for chaperone activity and for lipid

interaction and protection as well. These results are in agreement with those obtained during *in vivo* experiments [5].

In conclusion, we have demonstrated the correlation between the dynamic oligomerization of Lo18 and its requirement for both lipid stabilization and protein protection *in vitro* activities. These results allow us to propose for the first time a low-resolution model for the spatial organization of Lo18 in a probably inactive conformation. The interaction between Lo18 and the lipids of the *O. oeni* membrane remains to be explored in more detail.

AUTHOR CONTRIBUTION

Magali Maitre performed protein expression and purification, SEC, and chaperone and lipochaperone activities. She also participated in preparation of the electron microscope and AUC samples. Aurélie Rieu participated to establish the protocols for chaperone and lipochaperone assays. Daphna Fenel and Guy Schoehn recorded the electronic microscopy data, and Guy Schoehn analysed the images and determined the low-resolution structure. Christine Ebel performed analysis of the AUC data. Jacques Covès, Stéphanie Weidmann and Jean Guzzo conceived the work and supervised the experiments. Magali Maitre, Jacques Covès, Jean Guzzo, Stéphanie Weidmann, Guy Schoehn and Christine Ebel contributed to writing the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the PSB (Partnership for Structural Biology) electron microscopy platform for access to the FEI CM12 LaB6 electron microscope. We thank also Aline Appourchaud for the AUC data acquisition and processing, and Dr Gael Goret for expert handling of the VEDA software.

FUNDING

This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Conseil Régional de Bourgogne [grant number 2009 B2R4 018].

REFERENCES

- Watson, K. (1990) Microbial stress protein. *Adv. Microb. Physiol.* **31**, 183–223
- Nakamoto, H. and Vigh, L. (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 294–306
- Narberhaus, F. (2002) α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol.* **66**, 64–93
- Yeh, C. H., Chang, P. F. L., Yeh, K. W., Lin, W. C., Chen, Y. M. and Lin, C. Y. (1997) Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10967–10972
- 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
- Laksanalamai, P., Maeder, D. L. and Robb, F. T. (2001) Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **183**, 5198–5202
- de Jong, W., Caspers, G. J. and Leunissen, J. (1998) Genealogy of the α -crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 151–162
- Horwitz, J. (1992) α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10449–10453
- Haslbeck, M., Kastenmüller, A., Buchner, J., Weinkauff, S. and Braun, N. (2008) Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* **378**, 362–374
- Matuszewska, M., Kuczyńska-Wisnik, D., Laskowska, E. and Liberek, K. (2005) The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *J. Biol. Chem.* **280**, 12292–12298
- MacRae, T. H. (2000) Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 899–913
- Lentze, N., Aquilina, J. A., Lindbauer, M., Robinson, C. V. and Narberhaus, F. (2004) Temperature and concentration controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2494–2503
- Chernik, I., Panasenka, O., Li, Y., Marston, S. and Gusev, N. (2004) pH-induced changes of the structure of small heat shock proteins with molecular mass 24/27 kDa (HspB1). *Biochim. Biophys. Acta* **324**, 1199–1203
- Török, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovski, V., Los, D., Vierling, E., Crower, J. and Vigh, L. (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3098–3103

- 15 Lunsdorf, H., Schairer, H. U. and Heidelberg, M. (1995) Localization of the stress protein SP21 in indole-induced spores, fruiting bodies, and heat-shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*. J. Bacteriol. **177**, 7092–7099
- 16 Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. and Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. Biochim. Biophys. Acta **1643**, 267–278
- 17 Horváth, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdi, L., Benkő, S., Józ, F. and Vigh, L. (1998) Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a 'fluidity gene'. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 3513–3518
- 18 Giese, K. C. and Vierling, E. (2004) Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state. J. Biol. Chem. **279**, 32674–32683
- 19 Balogi, Z., Cheregi, O., Giese, K. C., Juhasz, K., Vierling, E., Vass, I., Vigh, L. and Horváth, I. (2008) A mutant small heat shock protein with increased thylakoid association provides an elevated resistance against UV-B damage in *Synechocystis* 6803. J. Biol. Chem. **283**, 22983–22991
- 20 Lonvaud-Funel, A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie Van Leeuwenhoek **76**, 317–331
- 21 Grandvalet, C., Assad-Garcia, J., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J. and Tourdot-Maréchal, R. (2008) Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cta* gene by heterologous complementation. Microbiology **154**, 2611–2619
- 22 Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garzyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B. and Davies, C. (2000) Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. Int. J. Food Microbiol. **55**, 27–31
- 23 Jobin, M. P., Delmas, F., Garzyn, D., Davies, C. and Guzzo, J. (1997) Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 609–614
- 24 Delmas, F., Davies, C. and Guzzo, J. (2001) Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. J. Mol. Microb. Biotech. **3**, 601–610
- 25 Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P. and Guzzo, J. (2005) 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
- 26 Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M. P., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J. F. and Davies, 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
- 27 Guzzo, J., Jobin, M. P. and Davies, C. (1998) Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. FEMS Microbiol. Lett. **160**, 43–47
- 28 Cavin, J. F., Prevost, H., Lin, J., Schmitt, P. and Davies, C. (1989) Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 751–753
- 29 Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. Biophys. J. **78**, 1606–1619
- 30 Conway, J. F. and Steven, A. C. (1999) Methods for reconstructing density maps of 'single' particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. J. Struct. Biol. **128**, 106–118
- 31 Franzetti, B., Schoehn, G., Hernandez, J. F., Jaquinod, M., Ruigrok, R. W. and Zaccai, G. (2002) Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea. EMBO J. **21**, 2132–2138
- 32 Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Med. Sci. **37**, 911–917
- 33 Shinitzky, M. and Barenholz, Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. Biochim. Biophys. Acta **515**, 367–394
- 34 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
- 35 Kim, K. K., Kim, R. and Kim, S. H. (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. Nature **394**, 595–599
- 36 Jaya, N., Garcia, V. and Vierling, E. (2009) Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106**, 15604–15609
- 37 Basha, E., Friedrich, K. L. and Vierling, E. (2006) The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. J. Biol. Chem. **281**, 39943–39952
- 38 Giese, K. C., Basha, E., Catague, B. Y. and Vierling, E. (2005) Evidence for an essential function of the N-terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**, 18896–18901
- 39 Koteiche, H. A., Chiu, S., Majdoh, R. L., Stewart, P. L. and Mchaourab, H. S. (2005) Atomic models by cryo-EM and site-directed spin labeling: application to the N-terminal region of Hsp16.5. Structure **13**, 1165–1171
- 40 Giese, K. C. and Vierling, E. (2002) Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein *in vivo* and *in vitro*. J. Biol. Chem. **277**, 6310–6318
- 41 Dudich, I. V., Zav'yalov, V. P., Pfeil, W., Gaestel, M., Zav'yalova, G. A., Denesuyuk, A. I. and Korpela, T. (1995) Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. Biochim. Biophys. Acta **1253**, 163–168
- 42 van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. and Vierling, E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. Nat. Struct. Mol. Biol. **8**, 1025–1030
- 43 Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S. and Buchner, J. (2004) Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **23**, 638–649
- 44 Lentze, N., Studer, S. and Naberhaus, F. (2003) Structural and functional defects caused by point mutations in the α -crystallin domain of a bacterial α -heat shock protein. J. Mol. Biol. **328**, 927–937
- 45 Feil, I. K., Malfois, M., Hendle, J., van der Zandt, H. and Svergun, D. I. (2001) A novel quaternary structure of the dimeric α -crystallin domain with chaperone-like activity. J. Biol. Chem. **276**, 12021–12029
- 46 Teixeira, H., Gonçalves, M. G., Rozès, N., Ramos, A. and San Romão, M. V. (2002) Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? Microb. Ecol. **43**, 146–153
- 47 Tsui, F. C., Ojcius, D. M. and Hubbell, W. L. (1986) The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. Biophys. J. **49**, 459–468
- 48 Török, Z., Horváth, I., Goloubinoff, P., Kova, E., Glatz, A., Balogh, G. and Vigh, L. (1997) Evidence for a lipochaperonin: association of active protein folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 2192–2197
- 49 Zhang, H., Fu, X., Jia, W., Zhang, X., Liu, C. and Chang, Z. (2005) The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: dissociation of oligomers is a prerequisite. Biochem. Biophys. Res. Commun. **330**, 1055–1061
- 50 Bova, M. P., Ding, L. L., Horwitz, J. and Fung, B. K. (1997) Subunit exchange of α A-crystallin. J. Biol. Chem. **272**, 29511–29517

Received 10 January 2012/22 February 2012; accepted 24 February 2012
Published as BJ Immediate Publication 24 February 2012, doi:10.1042/BJ20120066



SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection

Magali MAITRE*, Stéphanie WEIDMANN*¹, Aurélie RIEU*, Daphna FENEL†, Guy SCHOEHN†‡, Christine EBEL†, Jacques COVES†¹ and Jean GUZZO*

*UMR PAM-équipe VALMIS, IUVV, 1, rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex, France, †Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS-CEA-UJF-Grenoble-1, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France, and ‡Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex, France

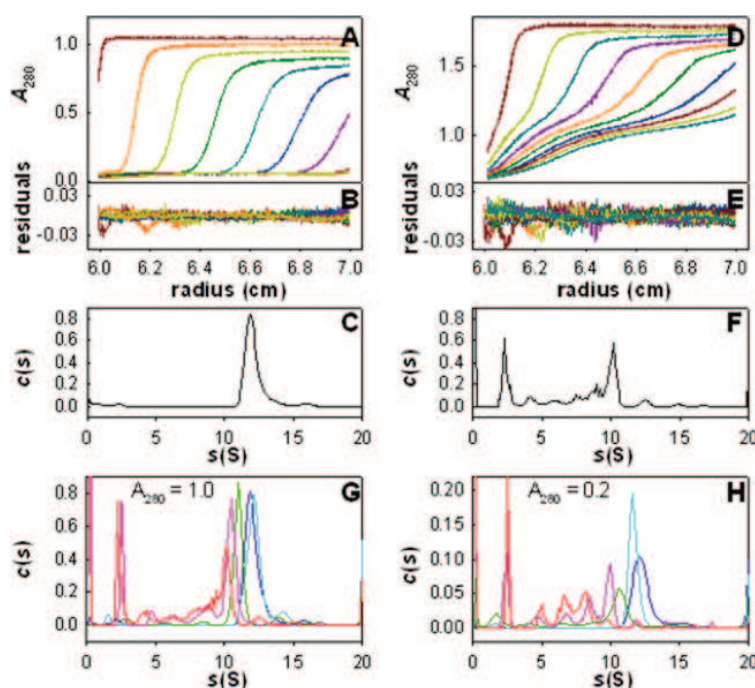


Figure S1 Concentration- and pH-dependent oligomerization of Lo18

(A) Superposition of experimental and fitted AUC profiles for Lo18 at 68 μ M for pH 5. The fit was obtained from the $c(s)$ analysis of the program Sedfit. (B) Superposition of the differences between the experimental and fitted curves for pH 5. (C) Results of the $c(s)$ analysis for Lo18 at 68 μ M for pH 5. (D–F) The same as (A), (B) and (C) for pH 9. Superposition of the $c(s)$ analysis for Lo18 at pH 5 (light blue), 6 (dark blue), 7 (green), 8 (pink) and 9 (red) at 68 μ M (G) and at 13 μ M (H).

¹ Correspondence may be addressed to either of these authors (stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr or jacques.coves@ibs.fr).

M. Maitre and others

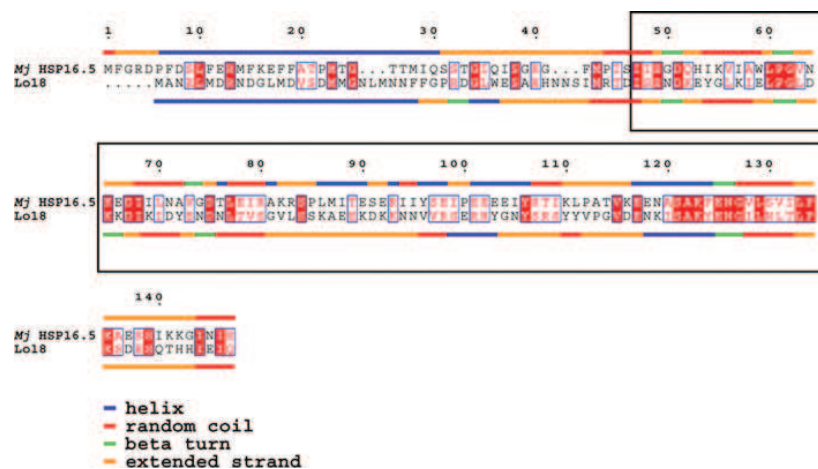


Figure S2 Sequence alignment of the α -crystallin domain of *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5 (MjHsp16.5) and Lo18, and secondary structure prediction for the whole sequence of these two proteins.

Sequence alignment performed with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) between the α -crystallin domain (boxed sequence) of MjHsp16.5 (residues 1–147) and that of Lo18 (residues 1–148). The Figure was made using the ESPript software (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>; [1]). Secondary structure prediction for MjHsp16.5 and Lo18 performed with the SOPMA server found at <http://www.expasy.org/tools/> have been added by hand.

REFERENCE

- Gouet, P, Robert, X and Courcelle, E. (2003) ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3320–3323

Received 10 January 2012/22 February 2012; accepted 24 February 2012

Published as BJ Immediate Publication 24 February 2012, doi:10.1042/BJ20120066

I.3. Résultats complémentaires

Les résultats de l'article précédent soulignent que la modification de l'alanine en position 123 en sérine provoque la perte du processus d'oligomérisation dynamique chez Lo18. De plus, ceci altère ses activités sur substrats protéiques aussi bien que lipidiques. L'importance du rôle des acides aminés du domaine α -cristallin dans la structure et les fonctions des sHsp, une fois de plus démontrée dans ce travail, nous a amené à réaliser une étude structures - fonctions sur deux autres protéines modifiées issues de la sHsp Lo18 : Y107A et V113A.

Les protéines modifiées Y107A, V113A et A123S ont été obtenues sur la base des travaux de Lentze et ses collaborateurs (2003) et correspondent respectivement à F94A/D, L100A et A109S de HspH de la bactérie *Bradyrhizobium japonicum* (Figure 46). Ces acides aminés ont été modifiés car ils possèdent des rôles clés dans la structure et les fonctions de la protéine HspH.



Figure 46 : Alignement des séquences protéiques du domaine α -cristallin de la sHsp Lo18 de *O. oeni* et de HspH de *B. japonicum* (d'après Weidmann *et al.*, 2010).

Dans un premier temps, l'impact des mutations ponctuelles sur la structure quaternaire de la protéine Lo18 a été évalué par chromatographie d'exclusion moléculaire à l'aide d'une colonne Superdex 200 10/300 GL. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 47 (pour une meilleure lisibilité, les données figurant dans l'article précédant pour les protéines Lo18 et A123S sont de nouveau représentées).

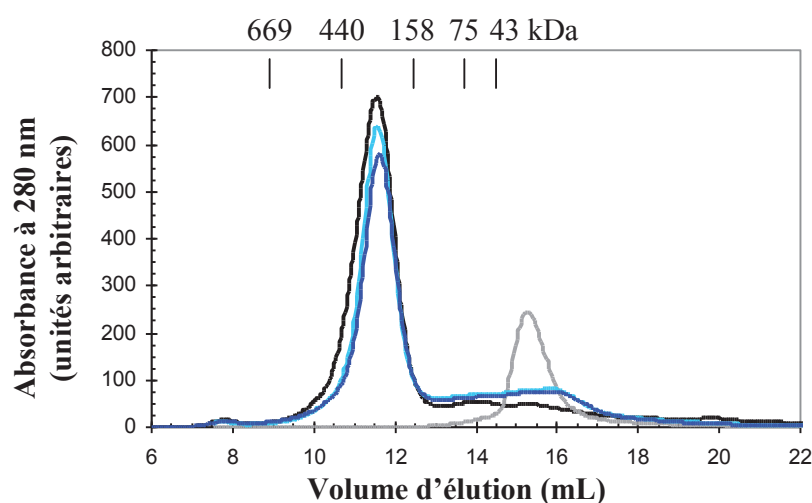


Figure 47 : Etude de la structure de la protéine Lo18 (noir) et des protéines modifiées Y107A (cyan), V113A (bleu), A123S (gris). Profil d'élution de 300 µg de sHsp en solution dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 réalisé par filtration sur gel à l'aide d'une colonne Superdex 200 10/300 GL.

Les profils d'élution obtenus pour les protéines Y107A et V113A sont semblables à celui de la protéine sauvage qui est éluée en un pic principal dont le volume d'élution est de 11,5 mL ce qui correspond à une espèce oligomérique d'environ 300 kDa soit 17-18 sous-unités. Un second pic moins bien résolu qui s'étend de 13 à 17 mL indique la présence de structures de masse moléculaire plus faible. **La substitution des acides aminés Y107 et V113 du domaine α -cristallin de Lo18 en alanine n'a donc pas d'impact sur l'oligomérisation de cette sHsp** contrairement au remplacement de l'alanine en position 123 en sérine qui, comme nous l'avons vu dans l'article précédent, empêche la formation d'oligomères de Lo18 de taille importante. Les travaux de Weidmann et ses collaborateurs (2010) vont également en ce sens. En effet, ils indiquent que l'oligomérisation des protéines Y107A et V113A est identique à celle de la protéine sauvage.

Dans un second temps, l'activité chaperon des protéines modifiées Y107A et V113A a été testée sur l'agrégation thermique de la citrate synthase (CS) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7 (Figure 48).

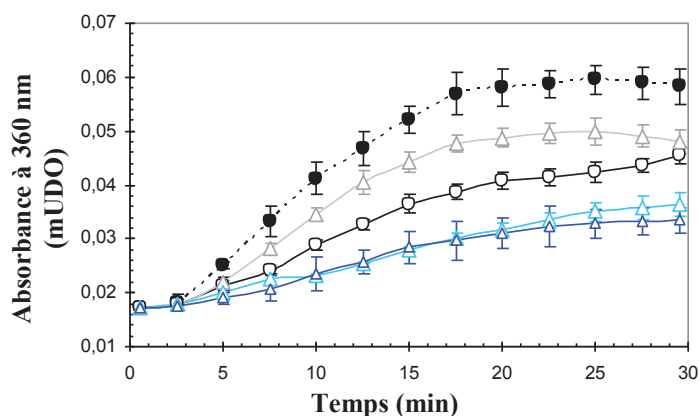


Figure 48 : Activité chaperon de la protéine Lo18 (noir) et des protéines modifiées Y107A (cyan), V113A (bleu), A123S (gris). Suivi de l'agrégation de 300 nM de CS (exprimée en unités d'absorbance) à 45°C en fonction du temps en absence (symboles pleins) ou en présence de 9,6 µM de sHsp (symboles ouverts). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes.

Au cours du temps, une augmentation de l'absorbance est observée traduisant l'agrégation de la CS sous l'effet de la température. Les protéines modifiées Y107A et V113A, ainsi que la protéine Lo18, ont la capacité de limiter cette agrégation de manière importante contrairement à A123S qui présente une activité chaperon altérée. Ces données sont en adéquation avec les travaux réalisés *in vivo* par Weidmann *et al.* (2010) qui indiquent que l'activité chaperon des protéines modifiées Y107A et V113A est identique à celle de la protéine sauvage. En revanche, l'activité chaperon de la protéine A123S est altérée comparée à la protéine native. **Ces résultats indiquent également que les modifications d'acides aminés réalisées dans le domaine α -cristallin de Lo18 qui n'affecte pas son oligomérisation conduisent à des sHsp possédant une bonne activité de protection vis-à-vis de la CS.** Le lien étroit ainsi observé entre l'activité sur substrat protéique et le degré

d'oligomérisation de Lo18 est en accord avec les données décrites dans la littérature pour d'autres sHsp (Lentze *et al.*, 2003; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). Par exemple, les travaux de Lentze et ses collaborateurs réalisés sur HspH de *B. japonicum* révèlent que la modification d'acides aminés dans le domaine α -cristallin de cette sHsp altérant son oligomérisation provoque également une diminution voire une perte totale de son activité chaperon. Ces données confirment l'importance du processus d'oligomérisation dans la fonctionnalité des sHsp.

Dans un dernier temps, l'activité lipochaperon des protéines Lo18 modifiées et sauvage a été évaluée par mesure d'anisotropie de fluorescence à l'aide de la sonde DPH sur des liposomes formés à partir de lipides extraits de membranes de cellules de *O. oeni* cultivées en conditions optimales et récoltées en phase exponentielle de croissance. Les résultats sont présentés dans la Figure 49.

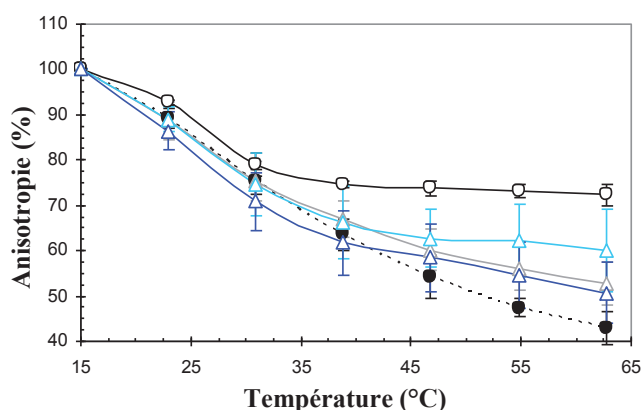


Figure 49 : Activité lipochaperon de la protéine Lo18 (noir) et des protéines modifiées Y107A (cyan), V113A (bleu), A123S (gris). Cinétique de fluidification (% d'anisotropie) de liposomes réalisés à partir de lipides extraits de la membrane de *O. oeni* cultivée en conditions optimales de croissance lors d'une rampe de température en absence (symboles pleins) ou en présence de 10 μ M de sHsp (symboles ouverts). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes.

Les modifications effectuées dans le domaine α -cristallin de Lo18 conduisent à une altération de l'activité stabilisante sur les substrats lipidiques. Effectivement, l'effet protecteur des protéines modifiées est observé à des températures plus importantes que pour la protéine sauvage : 45°C pour Y107A, 55°C pour V113A et A123S contre 31°C pour Lo18. Cependant, des résultats différents ont été obtenus *in vivo* avec les protéines V113A et A123S lors de la mesure de stabilisation membranaire chez *E. coli* (Weidmann *et al.*, 2010). En effet, ces protéines gardaient leur capacité à réguler la fluidité membranaire de cette bactérie. Deux hypothèses sont alors envisageables : (i) l'étude de Weidmann *et al.* ayant été menée *in vivo* en système hétérologue, d'autres composants cellulaires ont pu intervenir dans le mécanisme de régulation de la fluidité membranaire ou (ii) les compositions en lipides membranaires étant différentes chez ces deux bactéries, il est alors possible d'envisager l'existence d'une spécificité d'action de Lo18 envers certains substrats lipidiques. En effet, la membrane de *E. coli* est principalement composée d'acide palmitoléique (Morein *et al.*, 1996) alors que la membrane de *O. oeni* possède en majorité de l'acide oléique (Grandvalet *et al.*, 2008). Pour

vérifier cette hypothèse, l'activité lipochaperon de Lo18 pourrait être mesurée sur des liposomes obtenus à partir de membranes de *E. coli* puis comparée aux résultats précédemment obtenus sur les liposomes réalisés à partir de membranes de *O. oeni*.

II. Caractérisation de l'interaction Lo18 – membrane plasmique

II.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la protéine Lo18 est capable d'exercer ses activités sur deux types de substrats bien différents : les protéines et les lipides. Dans la littérature, la capacité des sHsp à limiter l'agrégation des protéines cellulaires est très bien documentée (Basha *et al.*, 2011; Haslbeck *et al.*, 2005; Lee & Tsai, 2005; Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a) cependant peu de données sont disponibles sur l'activité lipochaperon des sHsp. Il a néanmoins été montré que les sHsp capables de se lier aux membranes exercent surtout un rôle d'agent stabilisant qui régule la fluidité membranaire lors de stress (Capozzi *et al.*, 2011; Torok *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002). Plusieurs études semblent également indiquer que l'interaction des sHsp avec les bicouches lipidiques est dépendante de la composition en lipides membranaires (Balogi *et al.*, 2005; Chowdary *et al.*, 2007; Tsvetkova *et al.*, 2002) et nécessite une réorganisation structurale des sHsp (Balogi *et al.*, 2008; Chowdary *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005).

A ce jour, les conditions qui gouvernent la liaison de Lo18 avec la membrane plasmique de *O. oeni* restent inconnues. Nous avons alors cherché à caractériser l'association qui s'établit entre Lo18 et la membrane de cette bactérie lors d'un stress éthanol, l'éthanol étant un composé naturellement présent dans le vin. L'ensemble des résultats obtenus a permis d'aboutir à un modèle original qui décrit l'implication, de manière chronologique, de Lo18 ainsi que la réactivité cellulaire de *O. oeni* lors de la réponse à un stress éthanol. Ce modèle révèle que dès les premières phases du stress Lo18 présente une affinité accrue pour la fraction membranaire et ceci au détriment de son activité de protection vis-à-vis des substrats protéiques. La structure oligomérique de Lo18 en présence de lipides a également été caractérisée révélant ainsi qu'au contact de liposomes réalisés à partir de phospholipides extraits des membranes de cellules de *O. oeni* cultivées en absence d'éthanol Lo18 s'organise majoritairement sous forme de dimères. La technique de chromatographie en phase gazeuse a révélé que la présence d'éthanol entraîne à long terme une modification de la composition en acides gras de la membrane plasmique de *O. oeni* qui se caractérise par une augmentation du taux d'acides gras saturés et cycliques (collaboration avec l'Institut MICALIS – AgroParisTech de l'INRA de Massy : F. Dubois-Brissonnet). Il apparaît également que l'activité lipochaperon de Lo18 sur des liposomes possédant cette nouvelle composition lipidique est moins importante permettant ainsi à Lo18 d'exercer une meilleure activité chaperon sur des substrats protéiques. L'impact d'autres stress (stress acide et phase stationnaire) a également été testé sur la composition en acides gras membranaires de *O. oeni* et sur l'activité lipochaperon de Lo18. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un papier soumis et de résultats complémentaires.

II.2. Article II

Title: A chronological model of the adaptation of *Oenococcus oeni* to ethanol stress involving both the small heat shock protein Lo18 and changes in membrane fatty acid composition.

Running title: Chronological adaptation of *O. oeni* to ethanol stress.

Authors: Magali MAITRE¹, Stéphanie WEIDMANN^{1*}, Vanessa DAVID¹, Florence DUBOIS-BRISSENET², Jacques COVES³ and Jean GUZZO¹.

¹ UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex, France,

² AgroParisTech – INRA – Institut Micalis, 25 avenue de la république, 91300 Massy, France,

³ Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS - CEA- UJF-Grenoble-1, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France.

Corresponding author : Stéphanie Weidmann, UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, F-21078 Dijon Cedex, France; tel: + 33 3 80 39 62 62; fax: + 33 3 80 39 62 63; e-mail: stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr

Keywords: Lactic acid bacterium, membrane, stress, small Hsp, lipids.

Soumis dans Journal of Biological Chemistry.

A chronological model of the adaptation of *Oenococcus oeni* to ethanol stress involving both the small heat shock protein Lo18 and changes in membrane fatty acid composition

Magali Maitre¹, Stéphanie Weidmann^{1*}, Florence Dubois-Brissonnet², Vanessa David¹, Jacques Covès³ and Jean Guzzo¹

¹ UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex, France,

² AgroParisTech, UMR Micalis, 25 avenue de la république, 91300 Massy, France,

³ Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CNRS - CEA- UJF-Grenoble-1, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex, France.

*Running title: Chronological adaptation of *O. oeni* to ethanol stress

To whom correspondence should be addressed: Stéphanie Weidmann, UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, F-21078 Dijon Cedex, France; tel: + 33 3 80 39 62 62; fax: + 33 3 80 39 62 63; e-mail: stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr

Keywords: Lactic acid bacterium, membrane, stress, small Hsp, lipids

Background: *O. oeni* grows in wine, an adverse environment containing an important concentration of ethanol

Results: Adaptation to ethanol requires the synthesis of Lo18 and the modification of membrane phospholipid composition

Conclusion: Lo18 preferentially interacts with lipids, however this affinity depends on phospholipid type

Significance: These results highlight the chronological events of the response of *O. oeni* to ethanol stress

SUMMARY

Oenococcus oeni is able to grow and to perform malolactic fermentation in wine. This medium contains high concentration of ethanol that has been proved to compromise both membrane and cytoplasmic proteins integrity. The present study addresses some mechanisms used by *O. oeni* to adapt to ethanol stress. We have determined that in the early steps of the stress, the transcription of the *hsp18* gene is up-regulated and the resulting sHsp Lo18 is addressed to the membrane where its complex quaternary structure is simplified. Lo18 participates to rigidify the membrane by a still unknown mechanism. During the course of adaptation to the presence of ethanol, changes of the phospholipids content occur that affect the affinity of Lo18 for the membrane. A chronological model bridging together the molecular chaperone and the lipochaperone activities of Lo18 along with the membrane phospholipids content during adaptation to ethanol stress is presented.

During growth, bacteria may encounter stressful conditions that can hamper their metabolic activity and viability. Because cytoplasmic membrane plays major roles in homeostasis process, exchanges with environment or cellular energetic, maintenance of membrane integrity is of crucial importance for cellular viability under stressful environment such as increase of temperature or ethanol presence. To cope with these harsh conditions, microorganisms use multiple adjustment machineries (1,2). One response to ethanol stress consists in modification of membrane phospholipids composition (3). For example, *Clostridium thermocellum* increases fatty acids chain lengths and synthesizes larger percentage of plasmalogens to counteract ethanol deleterious effects (4) and *Oenococcus oeni* changes phospholipids head groups and membrane fatty acid composition in response to ethanol stress (5,6).

In addition to lipid modifications, heat shock proteins (Hsp) are produced when the bacterial envelope detects variations of cellular environment. For example, in the presence of the membrane fluidizer bimocmolol, a hydroxylamine derivative, the cyanobacteria *Synechocystis* induces the synthesis of Hsp70, also known as the molecular chaperone DnaK (7). The chaperone activity of Hsp in bacteria consists to help cytoplasmic proteins to acquire active conformation and to protect them against aggregation due to stressful conditions (8). Furthermore, several Hsp present the capacity to bind membrane as described for DnaK and GroEL (9). These molecular chaperones appeared in membrane fraction of *Bacillus subtilis* during a short-term ethanol stress. Torok *et al.* (1997) have also shown that under heat stress GroEL of *Synechocystis* is able to interact *in vitro* with model lipid membranes and to increase the molecular order of lipid bilayers with the consequence to stabilize the membrane (10).

In the same way, some eukaryotic and prokaryotic small heat shock proteins (sHsp), a particular subclass of Hsp with a molecular mass ranging from 12 to 43 kDa, have a lipochaperone activity *i.e.* they are able to bind membrane and to regulate bilayer fluidity (2,11,12) which is named lipochaperone activity. sHsp form large oligomers which determine their chaperone activity (8,13-15). The association of sHsp with lipids seems related to conformational changes as described for mammalian Hsp22, localized to plasma membrane of human neuroblastoma cell line (16). Oligomer dissociation is a prerequisite for the membrane binding process of Hsp16.3 from *Mycobacterium tuberculosis* (17). Hsp17, which is able to interact with thylakoid membranes of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PPC 6803 under stress conditions, also requires oligomer dissociation for lipid binding (18). Actually, this protein associates with liposomes formed by *Synechocystis* membrane lipids as dimers (18). Affinity of sHsp for lipids can be dependent on the phospholipid type. For instance, mammalian Hsp22 binds anionic lipid vesicles but not liposomes with neutral charge (16). Binding experiments between Hsp17 and polar lipids reveal a very strong interaction between the *Synechocystis* sHsp and monoglucosyldiacylglycerol (19). In addition, membrane binding of Hsp17 or human alpha-crystallin is governed by lipid selectivity and leads to preservation of membrane structure and integrity during thermal adaptation (20).

O. oeni is a lactic acid bacterium responsible for malolactic fermentation in wine (21). Wine is considered as a very harsh environment for bacterial growth in particular because of the presence of ethanol and of acidic pH. The synthesis of the sHsp Lo18 from *O. oeni* is up-regulated during ethanol stress (22-24) and its capacity to protect proteins (molecular chaperone activity) and to stabilize lipids (lipochaperone activity) was demonstrated by *in vivo* and *in vitro* experiments (15,25-27). Lo18 was detected in association with *O. oeni* membrane after the cells were shocked by addition of ethanol or benzyl alcohol (26,28). These compounds are known as membrane fluidizing agents (3,29,30). More recently, we provided strong evidence for a relationship between the dynamic oligomerization of Lo18 and its role in membrane stabilization and protein protection (15). Interestingly, the best liposome stabilization activity of Lo18 was observed at pH 7, when the protein preparation appeared as a mixture of species dominated by 12-subunit oligomers formed by association of dimeric building blocks. In the present work, we used liposomes prepared with lipids extracted from *O. oeni* cells grown or not in the presence of ethanol to address conditions that govern the binding of Lo18 to the membrane. We infer from the results that this interaction depends on the phospholipid content of the cytoplasmic membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains, growth conditions and Lo18 purification - *O. oeni* ATCC BAA-1163 was grown at 30°C in modified FT80 (mFT80) medium (31) inoculated with precultures performed in the same medium at an initial absorbance at 600 nm (A_{600}) of 0.1. Cells were harvested in exponential growth phase when A_{600} reached 0.4. Stressed-cells were obtained from cultures in mFT80 supplemented with 8% ethanol (v/v). Lo18 was produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3) star bearing the plasmid pET28a-*hsp18* (27) and grown under aerobic conditions at 37°C in Luria-Bertani broth (LB) supplemented with kanamycine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Lo18 expression and purification were performed according to (12). The purified protein was stored at 3 mg.mL^{-1} and at -20°C in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.

Liposomes preparation and fluidity measurements - Liposomes were prepared with total lipids from 50 absorbance units of *O. oeni* cells harvested in exponential-phase during growth in optimal culture conditions (control-liposomes) or in the presence of 8% ethanol (v/v) (ethanol-liposomes). Lipids extraction and liposomes preparation were carried out as described by (12) and (26). Liposomes were kept for a maximum of 1 week at 4°C. Liposome fluidity measurements were performed by using the fluorescence anisotropy method with 1,6 diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as a probe (Sigma, France). Experiments were done in the absence or presence of 9.6 μM Lo18 and a mass ratio of 1:2 was used between Lo18 and liposomes. Ten minutes after addition of 3 μM DPH, the fluorescence intensity was recorded at 402 nm with excitation at 352 nm using a Fluorolog 3 spectrofluorimeter (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon). Temperature ramping from 15 to 70°C with a rate of 5°C.min⁻¹ was controlled by a Peltier system (Wavelength Electronics). Each experiment was performed in triplicate. Lysozyme was used as negative control.

Fatty acids analysis - One milliliter of liposomes prepared as described above or total phospholipids from 50 absorbance units of *O. oeni* cells were used for lipids analysis. Extraction and methylation of fatty acids were performed according to (32). When necessary, fatty acids methyl esters (FAME) were concentrated under nitrogen flow. Analytical gas chromatography (GC) of FAME was carried out on a 6890HP system (Agilent Technologies) equipped with a capillary column (25m, 0.22 mm i.d.) coated with 0.25 μm BPX 70 (SGE, Ring Wood, Victoria, Australia) and a flame detector. Column temperature was set at 100°C for 1 min and then increased to 170 at the rate of 2°C.min⁻¹. The data were acquired with an HPCORE Chemstation system (Agilent Technologies) and expressed as a percentage of the area of the main peaks. Individual fatty acids were identified using commercial FAME standards. For each condition, the results are the average of six GC profiles (2 injections of 3 extractions prepared from independent cultures or liposomes).

Chaperone activity in the presence of liposomes - Citrate synthase (CS) was prepared as described in (12). CS at a concentration of 300 nM was thermally denatured 45°C in the presence or absence of 9.6 μM of Lo18 in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7 containing different Lo18:liposomes ratios (1:25, 1:2, 1:0.3 and 1:0.04 (m:m), corresponding to 12.5, 92.5, 925 and 9250 μg of lipids respectively). Aggregation was followed by light scattering measurement at 360 nm (Uvicon XS70 spectrophotometer equipped with a Peltier thermosystem, Secoman, France). Three independent experiments were carried out for each condition. Lysozyme was used as negative control.

RNA extraction and reverse transcription - Total RNA from *O. oeni* cells were extracted during exponential phase when bacteria grown in optimal culture conditions or in the presence of 8% ethanol (v/v) for 30 min, 16 h or 36 h. Nucleic acids were extracted by using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and dissolved in 30 μL of ultra pure water. RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm. DNA contamination was removed by DNase treatment (Fermentas) prior to reverse transcription. Absence of DNA was checked by RT-PCR. Then, cDNA were obtained by using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) as recommended.

Real-time PCR experiments - Specific primers (Table 1) used to amplify cDNA were purchased from Sigma (France).

Table 1: Specific primers used to amplify the target genes and function of the corresponding proteins.

Target gene	Product	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon length (pb)
<i>ldhD</i>	D-lactate dehydrogenase	GCCGACAGTAAAGAACTTGATG	TGCCGACAACACCAACTGTTC	102
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	CGCCCCGACAAACCGCATAAA	CAAGGACTCATAGATTGCCGAA	95
<i>hsp18</i>	heat shock protein	TATGATGGGCAACTTGAT	AACTCCTGATACCGTTAG	199

Real-time PCR was performed according to (33) on a CFX96TM Real-time system (Biorad, France) with the Go Taq® qPCR Master Mix (Promega, France) in 96-well plates. Results were expressed

using the $2^{\Delta\Delta CT}$ method (34). Normalization was performed thanks to a calibrator condition (mid-exponential-phase-cells growing in optimal culture conditions) and two reference genes (*ldhD* and *gyrA*) were used. For each condition, experiments were carried out with cDNA obtained from RNA extracted during three independent cultures.

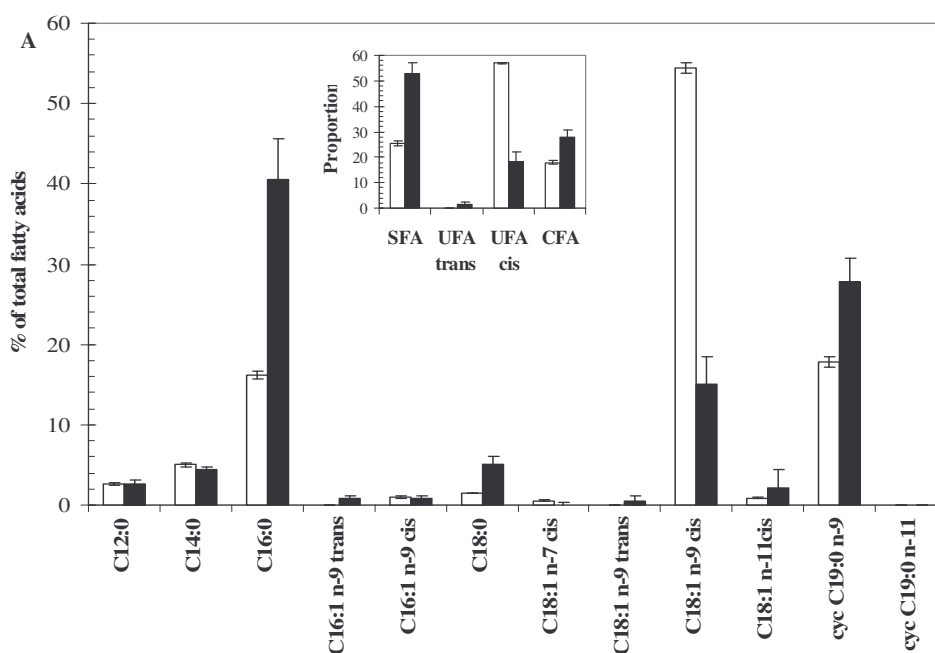
Cross-linking experiments and immunoblotting - Lo18 (1.5 μ M) was incubated in the absence or presence (mass ratio Lo18:liposome of 1:2) of either control- or ethanol-liposomes for 5, 15, 30 and 60 min at 42°C. Cross-linking was carried out by adding freshly prepared bis(sulfosuccinimidyl) suberate solution (BS³) in cross-linking buffer (25 mM MES pH 7.5, 25 mM NaCl, 0.5 mM DTT) so the final concentration of BS³ was 2 mM. The mixture was further incubated for 30 min at room temperature (25,35). Then, samples (1.7 or 2.6 μ g of cross-linked Lo18) were separated onto 12% SDS-PAGE gel before Western blot analysis using antibodies to Lo18 as previously described in (36). A densitometric analysis of the band intensity was performed using a gs 800 densitometer scanner and Quantity One® version 4.6.6 software (Bio-Rad Laboratories, France).

Statistical analysis - A one way ANOVA and a Holm-Sidak test ($n=3$, $P < 0.05$) were used to locate significant differences. SigmaStat® version 3.0.1 software (SPSS Inc.) was used for statistical analysis.

RESULTS

***hsp18* gene expression during growth of *O. oeni* in the presence of ethanol** - Relative expression levels of *hsp18* were measured during growth of *O. oeni* in the absence or in the presence of ethanol after 30 min, 15 h or 36 h. The highest level was obtained after 30 min of culture in the presence of ethanol with a 27-fold increase in gene expression compared to the unstressed condition. Then, after 16 and 36 h, the transcript level remained important but decreased to 16 and 9-fold, respectively.

Membrane stabilization by Lo18 is phospholipid-dependent - The fatty acid composition of liposomes and membranes issued from control- or ethanol-stressed conditions were analyzed by gas chromatography and compared. Results displayed in Figures 1A and B show that the fatty acid content of both liposomes and whole *O. oeni* cells are very similar regardless of the culture conditions.



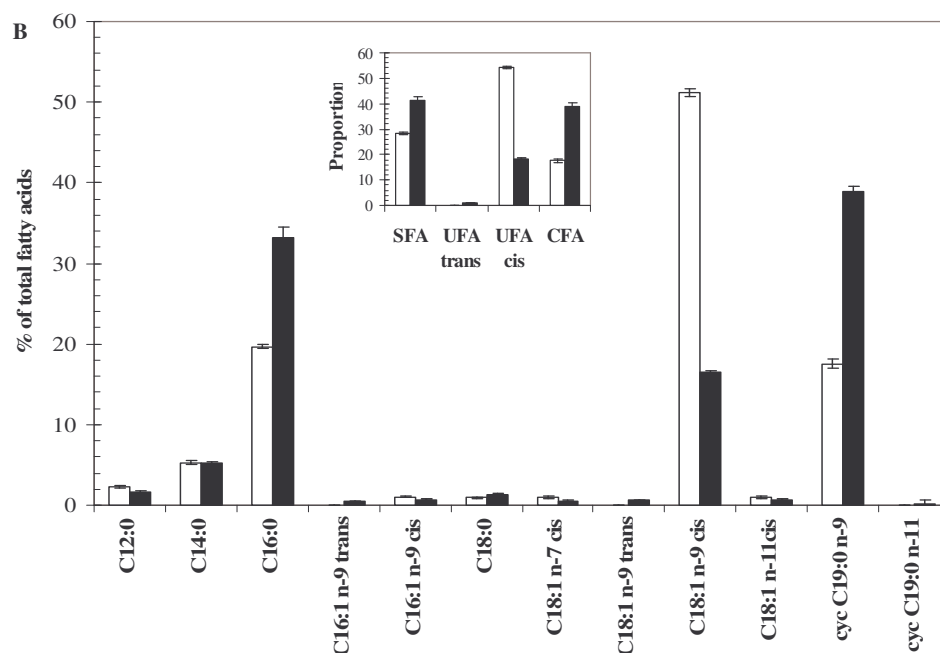


Figure 1. Fatty acids content of whole *O. oeni* cells and of their related liposomes. Fatty acid composition (% of the total fatty acid content) of liposomes prepared with lipids extracted from *O. oeni* cells (A) and whole *O. oeni* cells (B). In each panel, the white columns correspond to optimal growth conditions and the black columns to cultures in the presence of 8% ethanol. Ratio of saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA) in *cis* or *trans* conformation and cyclic fatty acids (CFA) is also presented for the whole cells and the related liposomes.

The liposomes are thus representative of the *O. oeni* membrane in terms of fatty acid composition and ratio, and can be used for further *in vitro* experiments (see below). GC analysis revealed the presence of eleven and twelve fatty acids in control-liposomes and ethanol-liposomes, respectively. Compared to the control conditions (Figure 1, white columns), the fatty acid composition was dramatically altered in ethanol-stress conditions (Figure 1, black columns). In the presence of ethanol, the percentage of oleic acid (C18:1 n-9) decreased to about 30% of the ratio found in control conditions while the percentage of the palmitic, stearic and lactobacillic acids (respectively C16:0, C18:0 and cycC19:0 n-9) increased significantly. In ethanol-stress conditions, a few percentage of unsaturated fatty acids in *trans* conformation (palmitelaidic and elaidic acids) was detected. These unsaturated fatty acids isomers probably resulted from the conversion of the *cis* to *trans* forms. Globally, the presence of ethanol in the growth conditions led to a decrease of the unsaturated fatty acids (UFA) concomitantly with an increase of the saturated (SFA) and cyclic fatty acids (CFA). These modifications are probably required for *O. oeni* to counteract the fluidizing effect of ethanol (see below).

For fluidity measurements, control- and ethanol-liposomes were mixed with DPH probe. The variation of membrane fluidity was then assayed by steady-state fluorescence anisotropy of DPH during temperature ramping (15–70°C), in the absence or presence of Lo18 (Figure 2).

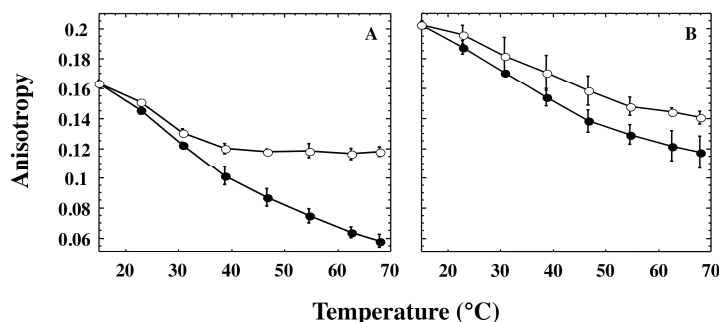


Figure 2. Influence of the growth conditions on the liposome fluidity. Evolution of the liposomes fluidity expressed in anisotropy values as a function of the temperature increase in the absence (closed symbols) and in the presence of 10 μM Lo18 (open symbols). Liposomes were prepared from membrane lipids extracted of *O. oeni* cells grown in optimal growth conditions (A) or in the presence of 8% ethanol (B). The mass ratio between protein and liposomes was 1:2. The experiments were done in triplicate.

The gradual decrease of the anisotropy value reflected control-liposomes fluidizing due to temperature increase and reached around 37% of the initial value at 68 °C (Figure 2A). The temperature-dependent increase in acyl chain motion was significantly reduced in the presence of Lo18. The membrane fluidity represented about 76% of the initial value at 31 °C and decreased only to 70% at the end of the temperature ramping. It is noteworthy that Lo18 has a maximal chaperone activity from 40–45 °C as a plateau was observed between these temperatures and 68 °C. These results are in perfect agreement with our previous data (15). With ethanol-liposomes (Figure 2B), the anisotropy value (0.2 units) was significantly higher than that observed with control-liposomes (0.16 units), hence reflecting a higher rigidity. The fluidizing effect of the temperature increase was less pronounced than in the control experiment and reached about 60% of the initial value at the end of the experiment. However, Lo18 was still able to reduce this fluidizing around 70% of the initial value, even if a plateau was not observed. Thus Lo18 is still able to protect ethanol-liposomes from fluidizing but less efficiently.

The chaperone activity of Lo18 is altered in the presence of liposomes - The ability of Lo18 to protect citrate synthase (CS) from thermal aggregation was checked in the presence of liposomes at different concentrations (Figure 3).

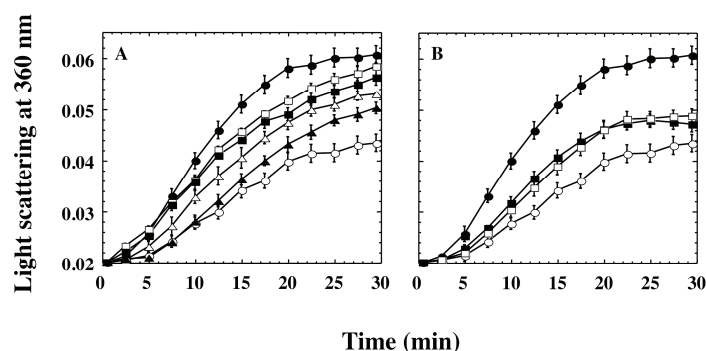


Figure 3. Chaperone activity of Lo18 in the presence of liposomes. The light scattering at 360 nm corresponding to thermal aggregation of 300 nM CS at 45 °C was recorded as a function of time in the absence (closed circles) or in the presence of 9.6 μM Lo18 (open circles). Panel A shows the dose-dependent inhibition of the chaperon activity caused by increasing amounts of control-liposomes (closed triangles, 12.5 μg; open triangles, 92.5 μg; closed squares, 925 μg; open squares, 9250 μg). Panel B shows the effect of ethanol-liposomes (closed squares, 925 μg; open squares, 9250 μg). The curves obtained without protein (closed circles) or in the presence of 9.6 μM Lo18 (open circles) were purposely reproduced. Experiments were performed in triplicate.

When heated at 45°C, CS forms insoluble aggregates that are detected by recording the increase of light scattering at 360 nm (Figure 3, closed circles). As already described (15), Lo18 readily protects CS from thermal aggregation at pH 7 (Figure 3, open circles) thanks to its chaperone activity. Addition of increasing amounts of control-liposomes caused a dose-dependent decrease of the chaperone activity with an apparent saturation around 925 µg of control-liposomes, a value corresponding to a protein:liposome ratio of 1:2 (Figure 3A). As a control experiment, we checked that the presence of liposomes had no effect on CS aggregation (data not shown).

The same experiment was performed with ethanol-liposomes. Figure 3B shows that they are much less efficient to inhibit the chaperone activity of Lo18 compared to control-liposomes, even if a similar apparent saturation was achieved for 925 µg of ethanol-liposomes. These results demonstrate that the chaperone activity of Lo18 is inhibited by the liposomes. It is likely that a differential distribution of the protein occurred between the lipidic phase and the denatured CS. This distribution would depend on the liposome concentration (Figure 3A) but also on the quality of the liposomes (Figures 3A and B), *i.e.* on the phospholipid content.

Control-liposomes cause sHsp Lo18 structural rearrangements - We have previously shown that the role of Lo18 in both membrane stabilization and protein protection is dependent on the oligomer plasticity of the protein (15,25,27). These activities are the highest at pH 7. Interestingly, different oligomeric forms of Lo18 coexist in solution at this pH. The protein forms dodecamers in majority and these oligomers come along with dimers and hexamers as well as a few amount of particules of 21 ± 1 subunits (15). However the identity of the oligomeric form active in membrane protection remained elusive. When Lo18 was incubated with the cross-linker BS³, three major bands that could correspond to a monomer, a dimer, a trimer were observed after SDS-PAGE separation and Western-blot development, along with some high molecular weight oligomers (Figure 4A).

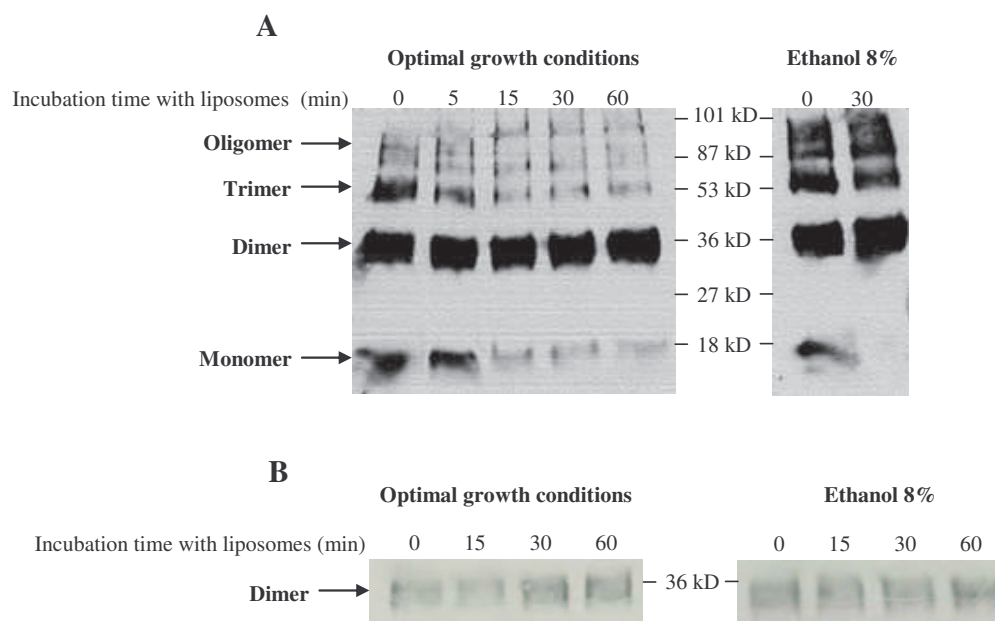


Figure 4. Immunoblots analysis of Lo18 cross-linked with BS³. Pure Lo18 was cross-linked with BS³ after incubation for the indicated times in the presence of either control-liposomes or ethanol-liposomes (protein:liposome ratio of 1:2). Samples were separated on 12% SDS-PAGE and revealed with antibodies to Lo18. Panel A shows the whole gel run with 2.6 µg of cross-linked Lo18. Panel B is a close-up view of the dimer after electrophoretic separation of 1.7 µg of cross-linked Lo18.

In the presence of control-liposomes, we observed a time-dependent decrease of the amount of monomer and of trimer trapped by BS³. The amount of cross-linked dimer increased concomitantly (Figure 4B). In the presence of ethanol-liposomes, only the monomer was no longer visible after an incubation of 30 min. No significant modification of the higher molecular weight oligomers quantity,

and especially of the dimer (Figure 4B), was observed. These results suggest a dynamic process of Lo18 oligomerization in favor of a dimeric form in the presence of control-liposomes. This process seems dependent on the phospholipid content as it does not occur in the presence of ethanol-liposomes.

DISCUSSION

After the step of alcoholic fermentation carried out by yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, the lactic acid bacterium *O. oeni* is able to perform malolactic fermentation in wine. During this process, *O. oeni* grows in a hostile environment containing several harsh compounds among which ethanol can represent up to 8-13%. The effects of ethanol on bacterial membrane are well documented. Polar headgroups of membrane phospholipids are able to embed this aliphatic alcohol, leading to an increase of membrane fluidity and permeability, an inhibition of membrane enzymes activity or an aggregation of cytoplasmic proteins (3,29,37-39), and eventually to disruption of membrane structures and functions as major consequences. In this context, *O. oeni* has evolved adaptation strategy consisting of adjustment of membrane fluidity by changing the proportion of saturated, unsaturated, cyclic or branched fatty acids, and synthesis of stress proteins. One of these stress proteins is the sHsp Lo18, itself partly involved in regulation of membrane fluidity. The present study deals with the interaction between Lo18 and bacterial membranes, adapted or not to ethanol.

In vitro experiment can be performed with liposomes provided that their phospholipid composition is representative of that of the bacterial membrane. The fatty acids analyses revealed that the phospholipid composition of *O. oeni* membrane and of the corresponding liposomes are very similar and depend on the growth conditions. For instance, the fatty acid content of control-liposomes resembles that of whole *O. oeni* cells cultured in the same conditions as judged from the present study that confirms previous results described in (5). In the same way, similar fatty acid contents were found in membrane of *O. oeni* cells grown in the presence of ethanol and in the corresponding liposomes. Besides, both qualitative and quantitative changes were observed in ethanol-stress conditions. We noticed that *O. oeni* adapted the phospholipid composition of its membrane to the presence of ethanol by increasing SFA and CFA proportions and by concomitantly decreasing the UFA content. The direct consequence of this adaptive process is the observed rigidification of the ethanol-liposomes compared to the control-liposomes. According to (40), membrane rigidification allows *O. oeni* to counteract deleterious effects of such a stress. Increasing the SFA:UFA ratio is the most common cellular mechanism used by yeast, bacteria and archae to modulate membrane fluidity in response to stress (1,41,42). More generally, changes of membrane fatty acids content are commonly used by bacteria in response to stress (43-45). For instance, decrease of oleic acid to the benefit of lactobacillic acid was already observed by Teixeira *et al.* (2002) in *O. oeni* membrane during ethanol stress. This conversion is catalyzed by the enzyme cyclofatty acid synthase (CFA), the transcription of the *cfa* gene being up-regulated in the presence of ethanol (5). Besides, we noticed a significant conversion of the palmitoleic acid and the oleic acid (*cis* C16:1 and *cis* C18:1) to its *trans* isomers. The longer linear chains of *trans* fatty acid contribute to increase the molecular order of the lipid bilayer (1). Such a mechanism was already described for the membranes of *Pseudomonas putida* in response to phenol and toluene stress (43,46).

Simultaneously to changes in membrane fatty acid composition to manage stress tolerance, *O. oeni* induces the expression of several specific genes such as heat-shock genes (*hsp*). One of them, *hsp18*, encodes for the sHsp Lo18, a protein already demonstrated to participate in modulation of membrane and liposome fluidity (15,26,27). Although the mode of action of Lo18 in such a modulation is still unclear, the protein was demonstrated to distribute between membrane and cytoplasm following ethanol or benzyl alcohol stress (26) and the best activity was correlated with the dynamic oligomerization of the protein (15). Selection of a dimeric form of Lo18 by the cross-link agent BS³ as a function of the incubation time in the presence of control-liposomes enlightens the oligomer plasticity of the protein. Association of dimers with membrane was already shown for Hsp16.3 of *M. tuberculosis* (47) and Hsp17 of *Synechocystis* (18). However, when the same experiment was performed in the presence of ethanol-liposomes, no significant modification of Lo18 oligomerization was observed. This shows that the lipid composition has a direct influence on Lo18 oligomerization and also strongly suggests that interaction of this protein with the membrane is

phospholipid-dependent. This hypothesis was further investigated by studying the role of Lo18 in both protein protection and membrane stabilization as a function of the phospholipid composition. We showed a dose-dependent inhibition of the chaperone activity of Lo18 when the protein was incubated in the presence of increasing amounts of control-liposomes along with a strong stabilization of these liposomes from 40-45°C during temperature ramping. This could suggest a preferential distribution of the chaperone that favors the interaction with the phospholipids rather than with the denatured proteins. In contrast, ethanol-liposomes were only able to poorly inhibit the chaperone activity of Lo18 and the protein weakly restored their fluidity. Altogether, these results argue for a better affinity of Lo18 for control-liposomes rather than for ethanol-liposomes. Such a dependence of Lo18 on the phospholipid composition is in agreement with the behavior of human alpha-crystallin or *Synechocystis* Hsp17 for which the nature of sHsp/membrane interactions depends on the lipid composition and extent of lipid unsaturation (20).

These results led us to assume the synthetic model of the chronological events of Lo18 response to ethanol stress displayed in Figure 5.

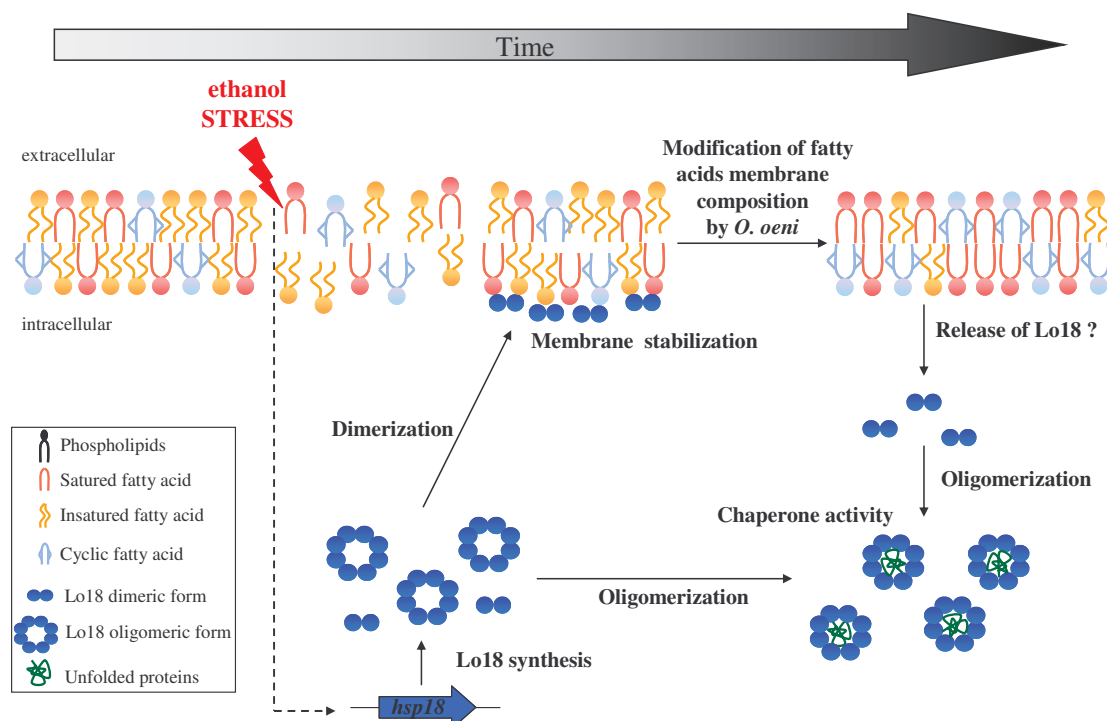


Figure 5. Chronological model of Lo18 activities in response to ethanol stress in *O. oeni* cells. Ethanol stress increases membrane fluidity. To maintain membrane integrity, *O. oeni* produces the sHsp Lo18 that has the dual role of both membrane stabilization and protein protection. We suggest that the oligomer plasticity of Lo18 is crucial for these activities and that dimers were preferentially found at the membrane location. Once the fatty acid membrane composition modified by bacterial cell, dimeric Lo18 is released from the membrane and made available for oligomerization and chaperone activity on cytoplasmic proteins.

The presence of ethanol induces the increase of membrane fluidity (29,37,39) and concomitantly a still unknown mechanism of signal transduction readily leads to the up-regulation of the *hsp18* gene. Thanks to its oligomer plasticity of Lo18, the dimeric building blocks of Lo18 can co-exist with higher oligomeric forms of the protein (15). Moreover, it is likely that Lo18 dimerization is enhanced at proximity of the membrane. The distribution of the protein between the membrane and the cytoplasm (26,28) suggests that Lo18 can participate both in membrane stabilization and in cytosolic protein protection. In the course of adaptation process, enzymes involved in fatty acid biosynthesis (48,49) or modification like CFA synthase (44) or isomerase (46) contribute to change the phospholipid composition of the membrane to counteract the fluidizing effect of ethanol. These lipid

transformations occur only in latter stages of the ethanol stress response. The weaker affinity of Lo18 for the ethanol-adapted membrane would allow a release of the protein in the cytoplasm where it keeps exerting its chaperone activity on ethanol-aggregated proteins. This schematic view is supported by the RT-qPCR results showing a strong transcription of *hsp18* after 30 min. of ethanol stress. The level of *hsp18* transcripts remained higher than in control cells even after 36 h in the presence of ethanol. These results are in agreement with the chronological model involving Lo18 both in early steps and in later stages of the ethanol stress response.

Acknowledgments - This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Conseil Régional de Bourgogne (grant number 2009 B2R4 018).

FOOTNOTES

To whom correspondence should be addressed: Stéphanie Weidmann, UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey, F-21078 Dijon Cedex, France; tel: + 33 3 80 39 62 62; fax: + 33 3 80 39 62 63; e-mail: stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr

The abbreviations used are: BS³, bis(sulfosuccinimidyl) suberate; CS, citrate synthase; CFA, cyclic fatty acid; DPH, 1,6 diphenyl-1,3,5-hexatriene probe; FAME, fatty acid methyl ester; GC, gas chromatography; SFA, saturated fatty acid; Hsp, heat shock protein; sHsp, small heat shock protein; UFA, unsaturated fatty acid.

REFERENCES

1. Denich, T., Beaudette, L., Lee, H., and Trevors, J. (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes *J. Microbiol. Methods* **52**, 149-182
2. Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., and Vigh, L. (2008) Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1653-1664
3. Ingram, L. (1976) Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose *J. Bacteriol.* **125**, 670-678
4. Timmons, M., Knutson, B., Nokes, S., Strobel, H., and Lynn, B. (2009) Analysis of composition and structure of *Clostridium thermocellum* membranes from wild-type and ethanol-adapted strains *Appl. Microbiol. Biotech.* **82**, 929-939
5. Grandvalet, C., Assad-Garcia, J., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., and Tourdot-Maréchal, R. (2008) Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation *Microbiology* **154**, 2611-2619
6. Teixeira, H., Goncalves, M., Rozes, N., Ramos, A., and San Romao, M. (2002) Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microb. Ecol.* **43**, 146-153
7. Torok, Z., Tsvetkova, N., Balogh, G., Horvath, I., Nagy, E., Penzes, Z., Hargitai, J., Bensaude, O., Csermely, P., Crowe, J., Maresca, B., and Vigh, L. (2003) Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3131-3136
8. Narberhaus, F. (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network *Microbiol. Mol. Biol.* **66**, 64-93
9. Seydlova, G., Halada, P., Fiser, R., Toman, O., Ulrych, A., and Svobodova, J. (2012) DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress *J. Appl. Microbiol.* **112**, 765-774
10. Torok, Z., Horvath, I., Goloubinoff, P., Kovacs, E., Glatz, A., Balogh, G., and Vigh, L. (1997) Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2192-2197
11. Nakamoto, H., and Vigh, L. (2007) The small heat shock proteins and their clients *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 294-306
12. Horvath, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M., Munnik, T., Saidi, Y., Goloubinoff, P., Harwood, J., and Vigh, L. (2012) Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections *Prog. Lipid R.* **51**, 208-220
13. Lentze, N., Studer, S., and Narberhaus, F. (2003) Structural and functional defects caused by point mutations in the alpha-crystallin domain of a bacterial alpha-heat shock protein *J. Mol. Biol.* **328**, 927-937
14. Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., and Buchner, J. (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins *Nature Struc. Mol. Biol.* **12**, 842-846
15. Maitre, M., Weidmann, S., Rieu, A., Fenel, D., Schoehn, G., Ebel, C., Covès, J., and Guzzo, J. (2012) The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection *Biochem. J.* **444**, 97-104
16. Chowdary, T., Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C. (2007) Interaction of mammalian Hsp22 with lipid membranes *Biochem. J.* **401**, 437-445
17. Zhang, H., Fu, X., Jiao, W., Zhang, X., Liu, C., and Chang, Z. (2005) The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: dissociation of oligomers is a prerequisite *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 1055-1061
18. Balogi, Z., Cheregi, O., Giese, K., Juhasz, K., Vierling, E., Vass, I., Vigh, L., and Horvath, I. (2008) A mutant small heat shock protein with increased thylakoid association provides an

- elevated resistance against UV-B damage in *Synechocystis* 6803 *J. Biol. Chem.* **283**, 22983-22991
19. Balogi, Z., Torok, Z., Balogh, G., Josvay, K., Shigapova, N., Vierling, E., Vigh, L., and Horvath, I. (2005) "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 346-354
20. Tsvetkova, N., Horvath, I., Torok, Z., Wolkers, W., Balogi, Z., Shigapova, N., Crowe, L., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J., and Vigh, L. (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13504-13509
21. Lonvaud-Funel, A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 317-331
22. Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J., and Diviès, C. (1997) A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase *Lett. Appl. Microb.* **24**, 393-396
23. Guzzo, J., Jobin, M., Delmas, F., Fortier, L., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B., and Diviès, C. (2000) Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 27-31
24. Guzzo, J. (2012) Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria *Int. J. Bioch. Cell Biol.* **10**, 1698-1705
25. Delmas, F., Pierre, F., Coucheney, F., Diviès, C., and Guzzo, J. (2001) Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* *J. Mol. Microb. Biotech.* **3**, 601-610
26. Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P., and Guzzo, J. (2005) 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
27. 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 Microb. Lett.* **309**, 8-15
28. Jobin, M., Delmas, F., Garmyn, D., Diviès, C., and Guzzo, J. (1997) Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos* *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 609-614
29. Weber, F., and De Bont, J. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 225-245
30. Gordon, L., Sauerheber, R., Esgate, J., Dipple, I., Marchmont, R., and Houslay, M. (1980) The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes *J. Biol. Chem.* **255**, 4519-4527
31. Cavin, J., Prevost, H., Lin, J., Schmitt, P., and Diviès, C. (1989) Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 751-753
32. Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B., and Leveau, J. (1999) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells *J. Appl. Microbiol.* **86**, 859-866
33. Desroche, N., Beltramo, C., and Guzzo, J. (2005) Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* *J. Microbiol. Methods* **60**, 325-333
34. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method *Methods* **25**, 402-408
35. Leroux, M., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G., and Candido, E. (1997) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656
36. Guzzo, J., Jobin, M., and Diviès, C. (1998) Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation *FEMS Microb. Lett.* **160**, 43-47

37. Dombek, K., and Ingram, L. (1984) Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane *J. Bacteriol.* **157**, 233-239
38. Almeida, L., Vaz, W., Stuempel, J., and Madeira, V. (1986) Effect of short-chain primary alcohols on fluidity and activity of sarcoplasmic reticulum membranes *Biochemistry* **25**, 4832-4839
39. Sikkema, J., De Bont, J., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons *Microbiol. Rev.* **59**, 201-222
40. Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P., 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
41. Littleton, J. (1979) Adaptive changes in membrane lipid composition and fluidity as the basis for ethanol tolerance *Drug and Alcohol Depend.* **4**, 189-195
42. Huffer, S., Clark, M., Ning, J., Blanch, H., and Clark, D. (2011) Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6400-6408
43. Weber, F., Isken, S., and De Bont, J. (1994) Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene *Microbiology* **140**, 2013-2017
44. Grogan, D., and Cronan Jr, J. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria *Microbiol. Mol. Biol.* **61**, 429-441
45. Cronan, J. (2002) Phospholipid modifications in bacteria *Curr. Opinion Microbiol.* **5**, 202-205
46. Diefenbach, R., Heipieper, H., and Keweloh, H. (1992) The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity *Appl. Microbiol. Biotech.* **38**, 382-387
47. Chen, Y., Lu, Y. J., Wang, H., Quan, S., Chang, Z., and Sui, S. (2003) Two-dimensional crystallization of a small heat shock protein HSP16.3 on lipid layer *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 360-366
48. Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C., and Cronan Jr, J. (1993) Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* *Microbiol. Rev.* **57**, 522-542
49. Lu, Y., and Rock, C. (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* *Mol. Microbiol.* **59**, 551-566

II.3. Résultats complémentaires

Les travaux présentés dans l'article précédant indiquent que les liposomes que nous utilisons sont représentatifs des membranes bactériennes de *O. oeni* car leurs compositions lipidiques sont similaires (Article II). De plus, ces données confirment les résultats obtenus par Grandvalet *et al.* (2008) qui indiquent que la composition lipidique membranaire de *O. oeni* est fortement modifiée lorsque cette bactérie se développe en présence d'éthanol. Dans le milieu vin, ce stress est très important mais de nombreux autres stress cellulaires sont retrouvés. Ces stress peuvent être à l'origine d'un retard dans le démarrage de la FML ou bien d'un arrêt de la croissance bactérienne. La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée afin d'évaluer l'impact de deux de ces stress sur la composition en acides gras de la membrane cytoplasmique de *O. oeni* (collaboration F. Dubois-Brissonnet). Pour ce faire, plusieurs types de liposomes ont été réalisés à partir d'acide gras extraits de membranes de *O. oeni* (i) cultivée en conditions optimales et prélevée en phase stationnaire de croissance ou (ii) cultivée à pH acide (pH 3,5). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 50 (pour une meilleure lisibilité, les données concernant les conditions contrôle et éthanol sont de nouveau représentées).

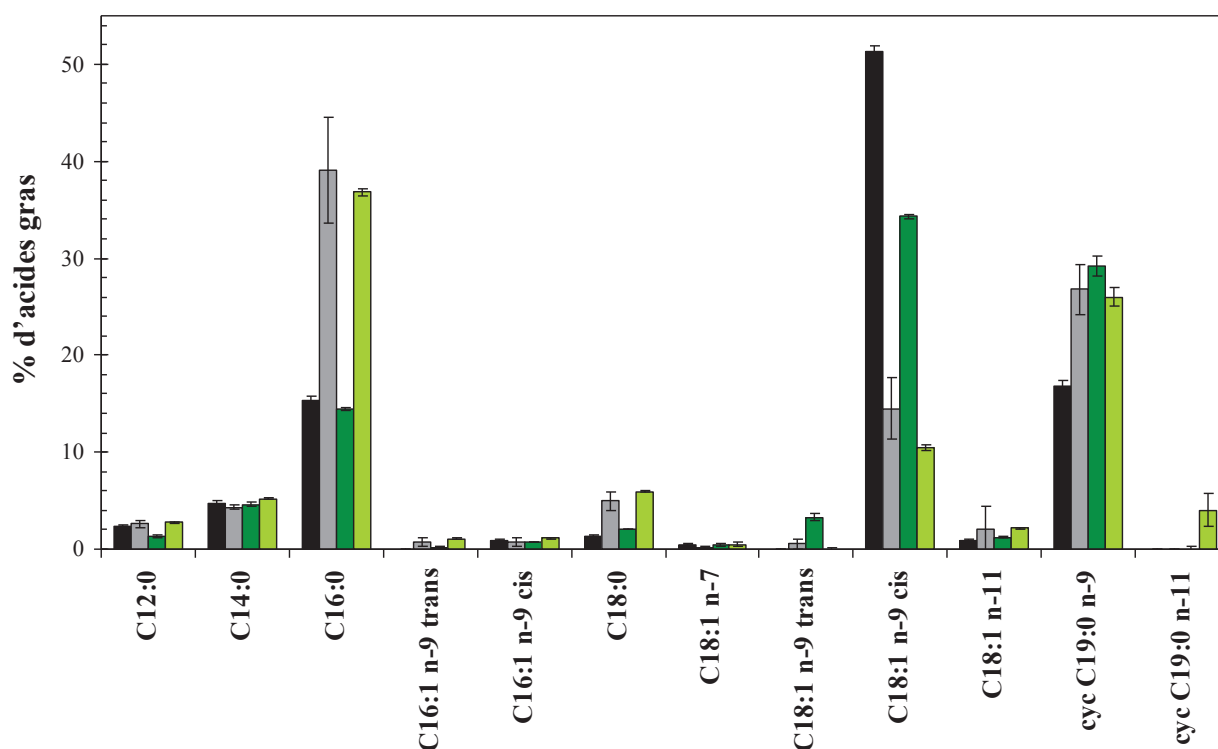


Figure 50 : Contenu en acides gras des liposomes. Composition en acides gras (%) déterminée par chromatographie en phase gazeuse des liposomes réalisés à partir de membranes de *O. oeni* cultivée (i) en conditions optimales de croissance et prélevée lors de la phase exponentielle (■) ou lors de la phase stationnaire de croissance (■), (ii) en présence d'éthanol 8% (■) ou (iii) à pH 3,5 (■). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir des résultats obtenus pour deux injections d'échantillons provenant de trois expériences indépendantes.

Ces données indiquent que les liposomes-contrôle, réalisés à partir de membranes de *O. oeni* en absence de stress (phase exponentielle + conditions optimales de croissance, code couleur noir), contiennent onze acides gras différents. **Les conditions stressantes, éthanol, phase stationnaire et pH acide, conduisent à une modification de la composition lipidique des liposomes.** On note en particulier l'apparition de deux nouveaux acides gras en conformation *trans* provenant de la transformation d'une partie de l'acide palmitoléique (C16:1 *n*-9) et de l'acide oléique (C18:1 *n*-9) initialement présents en conformation *cis*. Dans le cas de la culture de *O. oeni* en pH acide, on observe également la synthèse d'un second acide gras cyclique : l'acide dihydrosterculique (cyc C19:0 *n*-11). De plus, la présence de stress induit une augmentation du taux d'acides gras saturés et cycliques, en particulier pour l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide lactobacillique (cyc C19:0 *n*-9), au détriment des acides gras insaturés comme l'acide oléique (C18:1 *n*-9). **Néanmoins, il apparaît que la composition en acide gras des liposomes-contrôle est proche de celle des liposomes-phase stationnaire et que celle des liposomes-éthanol est similaire à celle des liposomes-acide.**

Dans un second temps, nous avons mesuré la fluidité de ces liposomes ainsi que l'activité lipochaperon de Lo18 par la technique d'anisotropie de fluorescence à l'aide de la sonde fluorescente DPH.

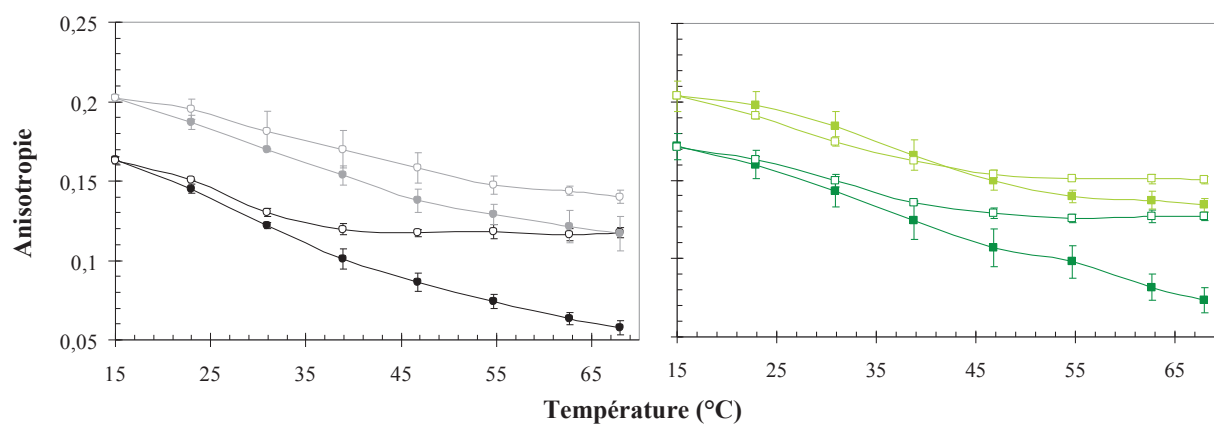


Figure 51 : Influence des conditions de croissance de *O. oeni* sur la fluidité de liposomes. Evolution de la fluidité de liposomes exprimée en valeurs d'anisotropie lors d'une augmentation de température en absence de protéine (symboles fermés) ou en présence de 10 μ M de Lo18 (symboles ouverts). Les liposomes ont été obtenus à partir de lipides extraits de membranes de cellules de *O. oeni* cultivées (i) en conditions optimales de croissance et prélevées lors de la phase exponentielle (■) ou lors de la phase stationnaire de croissance (■), (ii) en présence d'éthanol 8% (■) ou (iii) à pH 3,5 (■). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes.

En absence de Lo18, une diminution des valeurs d'anisotropie traduisant une fluidification des liposomes est observée lors de l'augmentation de la température. De plus, les valeurs d'anisotropie obtenues pour les liposomes-contrôle sont proches de celles observées pour les liposomes-phase stationnaire quelque soit la température considérée. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues

pour les liposomes-éthanol et -acide ce qui signifie qu'ils sont plus fluides. Ceci peut s'expliquer par la composition en acides gras des liposomes-éthanol et -acide qui sont plus riches en acides gras saturés et cycliques et plus pauvres en acides gras insaturés. Cette rigidité membranaire permet à *O. oeni* de limiter l'entrée dans la cellule de composés indésirables et d'empêcher la fuite des molécules intracellulaires d'intérêt lors de stress.

De plus, **la présence de Lo18 permet de limiter la fluidification des liposomes. Cependant, l'effet stabilisant varie en fonction du type de vésicule considéré** car l'écart constaté entre la cinétique obtenue en présence et en absence de la sHsp est différent. Les résultats indiquent en particulier que Lo18 possède une activité lipochaperon plus importante dans le cas des liposomes-contrôle et -phase stationnaire. Ces résultats sont en adéquation avec le modèle d'action de Lo18 proposé dans l'Article II et pourrait traduire une différence d'affinité de Lo18 vis-à-vis des lipides.

Au vu de ces résultats, il nous est apparu intéressant d'étudier la spécificité d'action de Lo18 pour certains lipides sous forme pure. Pour ce faire, l'activité lipochaperon de Lo18 a été mesurée sur des liposomes synthétiques réalisés à partir de phospholipides commerciaux. Quatre lipides ont été choisis sur la base d'une étude bibliographique (Grandvalet *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2002). Nous avons sélectionné les deux acides gras et les deux phospholipides les plus abondamment représentés dans la membrane cytoplasmique de *O. oeni* lorsque cette bactérie est cultivée en conditions normales de croissance (c'est-à-dire en milieu FT80m pH 5,3). Il s'agit de l'acide oléique (C18:1) et de l'acide palmitique (C16:0) puis de la phosphatidyléthanolamine (PE) et du phosphatidylglycérol (PG). Les lipides testés sont donc le dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG), le dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPE), le dioléylphosphatidylglycérol (DOPG) et le dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE). La fluidité des différents liposomes en absence ou en présence de Lo18 a été évaluée par anisotropie de fluorescence lors d'une rampe de température. Un témoin négatif a été réalisé à l'aide de lysozyme qui ne possède pas d'activité lipochaperon. Les cinétiques de fluidification obtenues sont présentées dans la Figure 52.

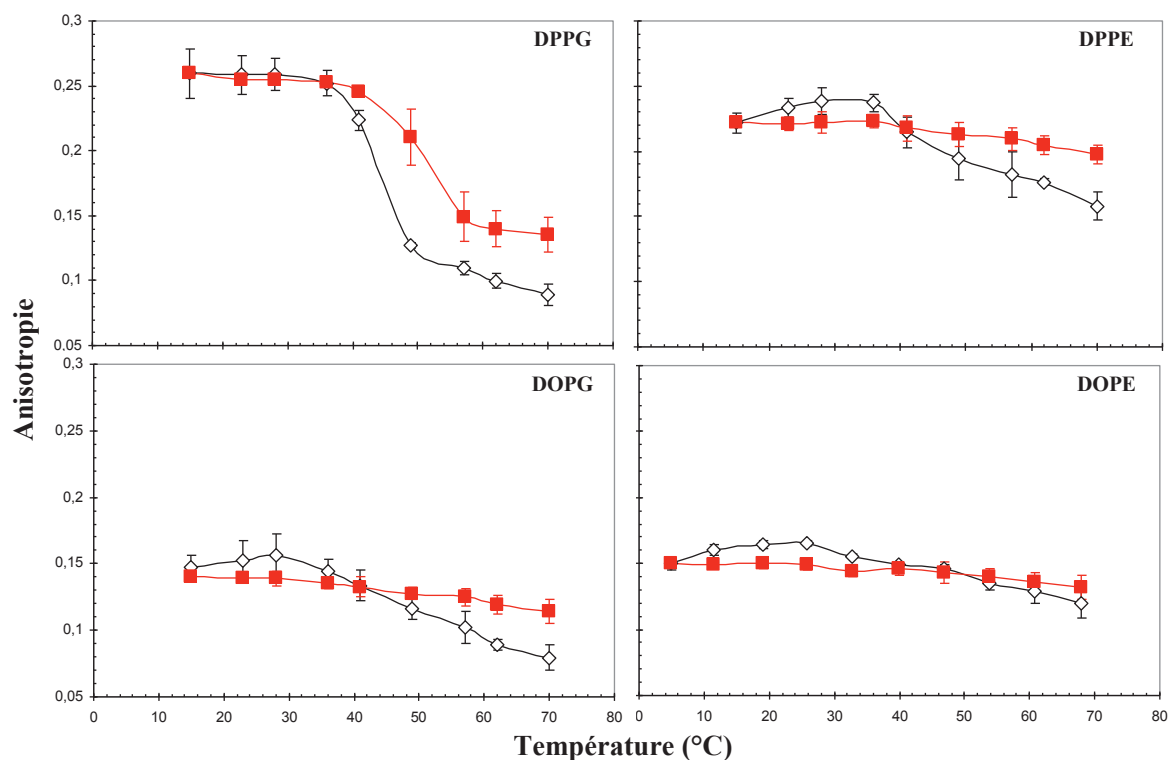


Figure 52 : Evolution de la fluidité de liposomes synthétiques composés de DPPG, DPPE, DOPG ou DOPE. Les résultats sont exprimés en valeurs d'anisotropie lors d'une augmentation de température en absence de protéine (◇) ou en présence de 10 μ M de Lo18 (■). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes.

En absence de Lo18, une diminution des valeurs d'anisotropie est observée quelque soit le phospholipide testé traduisant une fluidification des liposomes lors de l'augmentation de la température. Concernant le DPPG, un changement de pente abrupt est observé aux alentours de 40°C (et ceci même en présence de la protéine Lo18). Il correspond à la transition de phase du DPPG ($T_M = 41^\circ\text{C}$) qui passe alors de la phase gel $L\beta$ (ordonnée) dont les valeurs d'anisotropie sont élevées à la phase liquide cristalline $L\alpha$ (désordonnée) qui est caractérisée par des valeurs d'anisotropie faibles et qui est donc plus fluide. En revanche, pour les autres lipides testés aucune transition de phase n'est observée. En effet, les liposomes constitués de l'acide oléique (DOPG et DOPE) sont toujours en phase cristalline quelque soit la température testée car le T_M de ces phospholipides est respectivement de -18 et -16°C . Au contraire le DPPE est quant à lui toujours en phase gel car son T_M est supérieur à 63°C .

En présence de Lo18, une réduction de l'effet fluidifiant due à la température est observée pour tous les phospholipides testés à l'exception du DOPE. Pour le DPPG, Lo18 a une action stabilisante sur la phase cristalline mais n'a pas d'impact sur phase gel. De plus, la présence de Lo18 permet d'augmenter de 10°C la température de changement de phase (T_M) du DPPG. Les résultats obtenus avec le DPPE et le DOPG indiquent que Lo18 est capable de stabiliser la fluidité de ces liposomes lorsque la température est supérieure à 40°C alors qu'ils sont respectivement en phase gel et en phase cristalline. Ces données pourraient signifier que **Lo18 n'a pas de spécificité d'action parmi les**

quatre phospholipides testés. C'est-à-dire que l'action de Lo18 semblerait indépendante de la structure des phospholipides lorsqu'ils forment une bicouche lamellaire et de la charge des vésicules car le PG est un phospholipide anionique alors que le PE est zwitterionique. Néanmoins, ces résultats ont été obtenus *in vitro* à partir de phospholipides synthétiques et de protéine Lo18 purifiée. Nous sommes donc loin du contexte physiologique, nous ne pouvons donc pas exclure l'existence d'une affinité différente de Lo18 en fonction du type de phospholipide dans les conditions *in vivo*. Les conclusions que nous venons de tirer sont différentes des résultats obtenus pour Hsp17 de *Synechocystis* qui s'associe uniquement avec la phase cristalline du 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) et du 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) (Torok *et al.*, 2001) et de Hsp22 des mammifères qui interagit préférentiellement avec des vésicules lipidiques chargées (Chowdary *et al.*, 2007).

Concernant le dernier phospholipide testé, le DOPE, quasiment aucun impact de Lo18 n'est observé. Ceci pourrait s'expliquer par la structure des liposomes car ici le DOPE n'est pas organisé en bicouche lamellaire mais en conformation hexagonale H_{II} regroupant les têtes polaires au centre des vésicules car sa température de transition de l'état lamellaire à l'état hexagonal (T_{LH}) est de 10°C. Ces résultats suggèrent que **Lo18 pourrait s'associer exclusivement avec les têtes polaires des phospholipides**. De plus, cette information est en accord avec les travaux de Jobin *et al.* (1997) qui signalaient que Lo18 s'associe à la membrane de manière périphérique puisque cette sHsp se décroche de la bicouche par des traitements doux (urée, $NaHCO_3$) qui cassent les liaisons faibles. Le mécanisme d'action membranaire utilisé par Hsp17 de *Synechocystis* semble différent de celui de Lo18. En effet, Hsp17 paraît exercer son activité lorsque cette sHsp est enchâssée dans la membrane (Balogi *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2012). Cette différence pourrait s'expliquer par les contextes cellulaires qui sont très éloignés dans les deux cas. En effet, Hsp17 interagit avec les membranes thylakoïdiennes de *Synechocystis* qui est une cyanobactérie d'eau douce alors que Lo18 s'associe avec la membrane plasmique de *O. oeni* qui est une bactérie fermentaire du vin.

En résumé, aucune spécificité de substrat lipidique pour Lo18 n'a pu être mise en évidence parmi les phospholipides testés qui présentent des longueurs de chaîne, des degrés d'insaturation et des têtes polaires différentes. Cependant, l'Article II révèle une forte influence de la composition en acides gras des liposomes-contrôle et -éthanol sur l'activité lipochaperon ainsi que sur la structure oligomérique de Lo18. Il serait alors tentant d'envisager que les interactions s'établissant entre Lo18 et la membrane de *O. oeni* puissent être gouvernée directement par le mélange de phospholipides au sein des membranes voire également de s'interroger sur l'existence de motifs membranaires. En effet, dans le cas de Hsp17, les travaux de Horvath *et al.*, (2012) et de Tsvetkova *et al.*, (2002) indiquent que cette sHsp semble s'associer avec la membrane en particulier dans des domaines membranaires riches en monoglucosyldiacylglycérol (MGlDG), substrat préférentiel de Hsp17.

III. Etude du transcriptome de la bactérie *O. oeni* suite à une fluidification membranaire

Introduction

Comme il a été décrit précédemment, la membrane cytoplasmique est un constituant cellulaire essentiel chez les microorganismes. Pour certaines bactéries, elle assure notamment un nombre important de fonctions comme la détection des signaux de l'environnement, le transport des éléments nutritifs et des déchets, la respiration.... Le maintien de l'intégrité de la membrane cytoplasmique est donc indispensable à la survie des microorganismes. Un paramètre important au sein de cette bicouche lipidique est la fluidité membranaire car plus la membrane sera fluide, plus la liberté de mouvement des constituants de la bicouche sera grande. Ceci peut, à terme, occasionner la fuite des constituants intracellulaires et l'entrée de molécules indésirables ou encore provoquer l'altération des activités des enzymes enchâssées dans la membrane. Par exemple, la présence de stress peut inhiber l'activité des H^+ -ATPases et ainsi supprimer le gradient de protons nécessaire à la synthèse des molécules d'ATP conduisant à terme à la mort cellulaire (Carreté *et al.*, 2002).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les paramètres physicochimiques du milieu où se développent les bactéries ont un impact très important sur la fluidité membranaire. Par exemple, la présence d'éthanol dans le vin entraîne un stress qui se caractérise par des perturbations des interactions lipide - lipide et lipide - eau des bicouches. Ceci a pour conséquence d'augmenter la fluidité membranaire ce qui impactera ensuite sur l'échange des molécules de part et d'autre de la membrane (Dombek & Ingram, 1984).

Afin de conserver leur fluidité membranaire dans un état optimal, les bactéries peuvent modifier la composition en phospholipides de leur membrane. Cette « adaptation homéovisqueuse » se traduit souvent par un changement du lipidome bactérien avec notamment la synthèse de nouveaux acides gras et la modification des acides gras existants : changement de la longueur des chaînes carbonées, du degré d'insaturation ou des têtes polaires des phospholipides (Cronan, 2002). Les microorganismes peuvent également faire appel à des protéines de réponse au stress comme les Hsp ou les sHsp pour réguler leur fluidité membranaire. Par exemple, GroEL et Hsp17 sont capables de s'associer avec les membranes thylakoidiennes de *Synechocystis* lors de stress où elles participent au contrôle de leur état physique et stabilisent la bicouche (Horvath *et al.*, 1998; Tsvetkova *et al.*, 2002).

Dans cette étude, nous avons utilisé l'alcool benzylique (BA), un solvant non polaire afin de fluidifier la membrane plasmique de *O. oeni*. Ce composé a été choisi car cette molécule neutre a la capacité de pénétrer à l'intérieur des bicouches lipidiques et par conséquent de les fluidifier (Gordon *et al.*, 1980) sans agréger les protéines cytoplasmiques. En revanche, nos mesures de viabilité cellulaire, de fluidité membranaire et nos expériences d'immunoblotting indiquent que la présence du BA a de nombreux

impacts sur la physiologie de *O. oeni* ainsi que sur l'activité enzymatique des H⁺-ATPases enchassées dans sa membrane cytoplasmique. L'étude du transcriptome global de *O. oeni* suite à un stress BA a également été réalisée. Grâce aux résultats obtenus par les biopuces, un schéma métabolique a pu être construit montrant ainsi les voies métaboliques de *O. oeni* sollicitées lors d'un stress fluidifiant sa membrane cytoplasmique.

Matériels et Méthodes

Les protocoles expérimentaux utilisés lors de cette étude (évaluation de la viabilité cellulaire, mesure de fluidité membranaire, dosage de l'activité H⁺-ATPasique, détermination de la composition en acides gras membranaires, immunoblotting et analyse transcriptomique) sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes.

Résultats

Impact du BA sur la viabilité cellulaire de *O. oeni*

L'impact de différentes concentrations de BA sur la viabilité de cellules de *O. oeni* ATCC BAA-1163 a été évalué grâce à des dénombrements sur milieu FT80m gélosé. Plusieurs concentrations en BA ont été choisies sur la base de travaux précédemment réalisés au laboratoire (Delmas *et al.*, 2001, Coucheney *et al.*, 2005) : 0, 30, 60, 100 et 120 mM. Les résultats obtenus à l'issue de ces stress sont présentés dans la Figure 53.

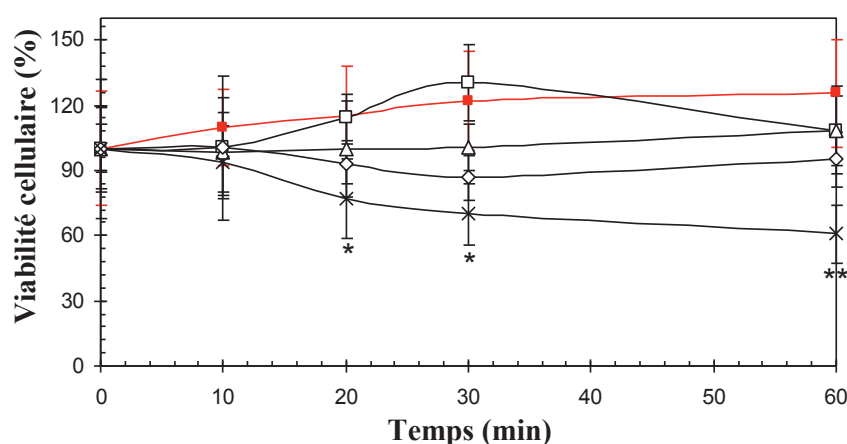


Figure 53 : Evolution de la viabilité cellulaire (%) de *O. oeni* ATCC BAA-1163 en présence de différentes concentrations de BA : 0 mM (■), 30 mM (□), 60 mM (△), 100 mM (◇) et 120 mM (×). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes. Les symboles ** et * indiquent les résultats significativement différents de la condition contrôle (0 mM) à 1% et à 5%.

La viabilité cellulaire de *O. oeni* n'est pas affectée pour les concentrations en BA allant de 0 mM à 60 mM. En revanche, à partir de 100 mM de BA la viabilité cellulaire diminue et ce phénomène

s'accroît pour 120 mM de BA dès les 20 premières minutes du stress. Ainsi, **la concentration de 60 mM de BA sera donc choisie pour les manipulations suivantes car elle n'induit pas de mortalité cellulaire**. De plus, cette concentration est identique à celle utilisée lors de travaux préalablement réalisés au laboratoire par Delmas *et al.* (2001) et Coucheney *et al.* (2005).

Impact du BA sur la fluidité membranaire de cellules de *O. oeni*

La fluidité membranaire de cellules de *O. oeni* a été mesurée par anisotropie de fluorescence en présence de BA. Après insertion de la sonde DPH, l'échantillon a été supplémenté avec 60 mM de BA. L'évolution de la fluidité membranaire au cours du temps est présentée dans la Figure 54.

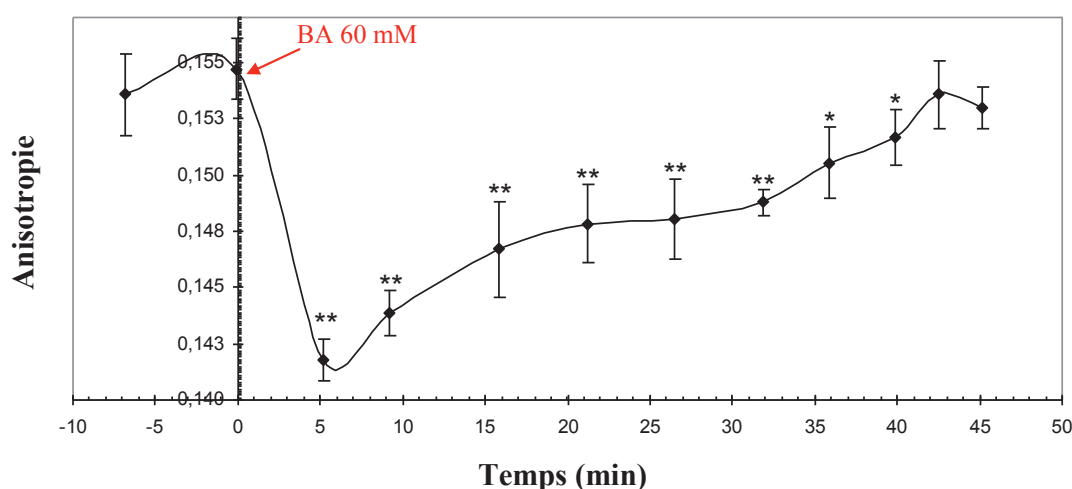


Figure 54 : Évolution de la fluidité membranaire (anisotropie) lors d'un stress BA 60 mM à 30°C sur des cellules de *O. oeni* ATCC BAA-1163. Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes. Les symboles ** et * indiquent des modifications de fluidité membranaire significatives respectivement à 1% et à 5% par rapport à la fluidité membranaire des cellules en absence de BA.

La concentration en BA utilisée (60 mM) provoque tout d'abord une diminution rapide de l'anisotropie de fluorescence traduisant ainsi une augmentation de la fluidité membranaire qui est maximale après 5 minutes de stress. **L'effet fluidifiant induit par le BA est transitoire car la membrane retrouve son état de fluidité initiale après 45 minutes de stress.** Cette rigidification membranaire montre la capacité de *O. oeni* à mettre en œuvre des mécanismes lui permettant de réguler l'état de fluidité de sa membrane. Par exemple, nous pouvons supposer que la sHsp Lo18 ait un lien avec cette régulation. Toutefois, ces travaux ont été réalisés en tampon MES-glucose, nous sommes donc relativement éloignés du contexte physiologique, nous ne pouvons donc pas exclure que cette réponse soit d'ordre mécanique ou physique.

Impact du BA sur l'activité H⁺-ATPasique de *O. oeni*

Les variations de fluidité membranaire pouvant affecter le bon fonctionnement des protéines enchâssées dans la membrane cytoplasmique, l'activité enzymatique des H⁺-ATPases membranaires a

été analysée. En effet, des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont mis en évidence que ces pompes à protons sont un bon modèle d'étude car elles participent à l'adaptation de *O. oeni* au milieu vin (Fortier *et al.*, 2003; Galland *et al.*, 2003; Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999). L'activité H⁺-ATPasique a été évaluée sur des extraits membranaires de *O. oeni* en absence ou en présence d'un stress BA (60 mM) pendant 5 et 30 min. Ces durées d'application des stress ont été choisies sur la base des travaux de fluidité membranaire présentés précédemment (Figure 54) car ils se situent respectivement lors de la fluidification maximale causée par le BA et lors de la rigidification de la fluidité membranaire. Les résultats obtenus pour les activités H⁺-ATPases sont présentés dans le Tableau VI.

Tableau VI : Activité H⁺-ATPasique d'extraits membranaires de *O. oeni* ATCC BAA-1163 après un stress BA 60 mM de 5 ou 30 minutes. Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir de trois expériences indépendantes. Le symbole ** indique les résultats significativement différents à 1%.

	activité spécifique H ⁺ -ATPases (μmol Pi.min ⁻¹ .mg protéines ⁻¹)
sans BA 5 min	0,159 ± 0,058
avec BA 5 min	0,130 ± 0,054
sans BA 30 min	0,189 ± 0,009
avec BA 30 min	0,028 ± 0,022 **

La présence de BA pendant 5 minutes ne modifie pas de façon significative l'activité spécifique H⁺-ATPasique mesurée sur des extraits membranaires provenant de cellules de *O. oeni*. En revanche, lorsque le BA est appliqué pendant 30 minutes, une diminution significative de l'activité des H⁺-ATPases est observée. Les travaux de Gordon et ses collaborateurs (1980) ont également mis en évidence une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase enchâssée dans la membrane plasmique du foie de rat pour des concentrations en BA supérieures à 40 mM. Nous pouvons alors envisager que **l'augmentation de la fluidité membranaire a un impact négatif sur l'activité des H⁺-ATPases** : la fluidification de la membrane de *O. oeni* pourrait avoir altéré la structure des protéines membranaires et donc modifié leur fonctionnalité. Une autre hypothèse pourrait également être proposée : il est possible que **la présence du BA au contact de la membrane ait dénaturé les protéines membranaires** contrairement aux protéines cytoplasmiques qui sont certainement protégées à l'intérieur de la cellule.

Impact du BA sur la composition en acides gras de la membrane cytoplasmique de *O. oeni*

Afin de réguler leur fluidité membranaire, les bactéries sont capables de modifier la composition en lipides de leur membrane. Dans le but de mettre en évidence ces éventuels changements chez *O. oeni* en réponse à un stress BA, la composition en acides gras de sa membrane cytoplasmique a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse en absence ou en présence de 60 mM de BA

pendant 5 et 30 min (collaboration F. Dubois-Brissonnet). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 55.

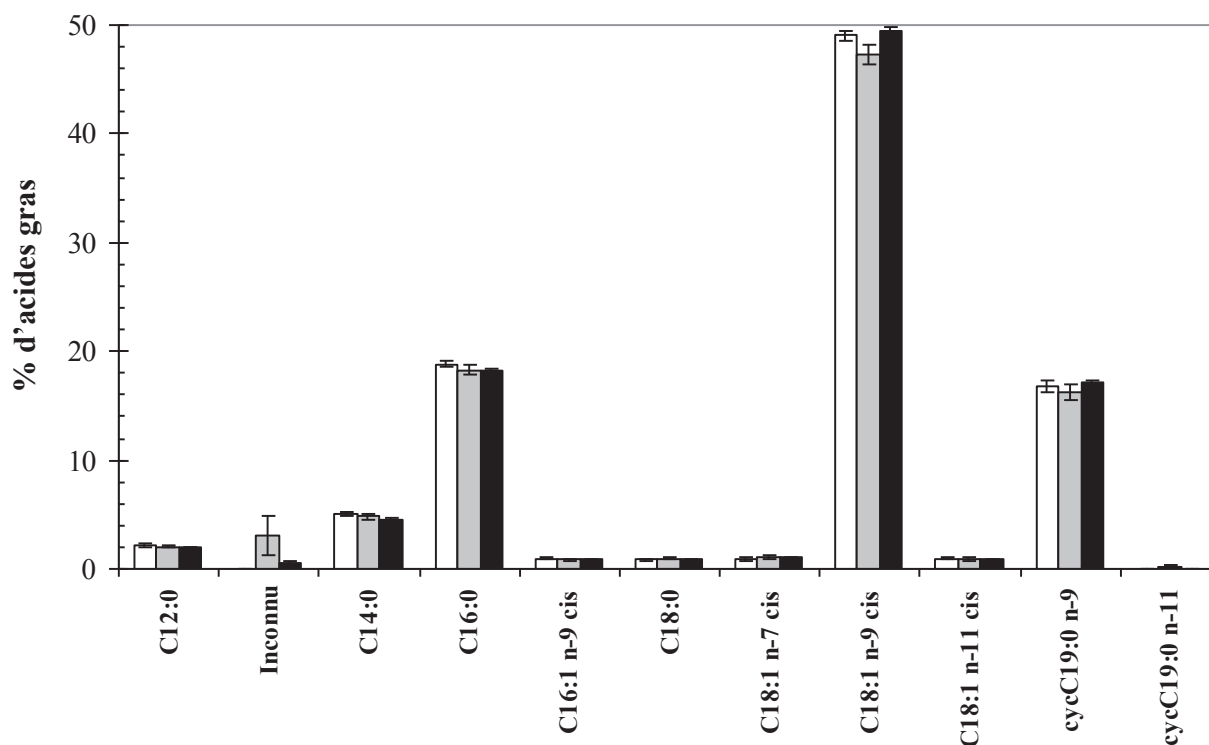


Figure 55 : Contenu en acides gras des membranes de *O. oeni* ATCC BAA-1163. Composition en acides gras (%) déterminée par chromatographie en phase gazeuse des membranes de *O. oeni* prélevées lors de la phase exponentielle en conditions optimales de croissance (□) et lors d'un stress BA 5 min (■) ou 30 min (■). Les moyennes et les écarts-type ont été calculés à partir des résultats obtenus pour deux injections d'échantillons provenant de trois expériences indépendantes.

La composition en acides gras membranaires est strictement identique quelque soit la condition considérée à l'exception de l'apparition d'un pic dont le composé reste encore à identifier (noté Inconnu). Dans la littérature, il est communément admis que le temps nécessaire à la modification du contenu en lipides des membranes bactériennes est en lien direct avec le temps de génération des microorganismes ($t_{1/2}$). Dans le cas de *O. oeni* qui présente un $t_{1/2}$ relativement important (de 4 à 6 h), il est tout à fait plausible que la modification des acides gras de sa membrane soit un processus lent. De plus dans nos conditions expérimentales, nous avons noté que la présence de 60 mM de BA a des effets importants sur la physiologie cellulaire de *O. oeni* car cette concentration inhibe la croissance bactérienne (Figure 53). Il est alors envisageable que le manque de développement bactérien puisse expliquer l'absence de modification au niveau du contenu en acides gras membranaires.

Impact du BA sur la synthèse de la sHsp Lo18

Afin de contrôler la fluidité de leur membrane, les bactéries peuvent également faire appel à des protéines de réponse au stress comme par exemple des sHsp. Dans le but de déterminer si *O. oeni*

utilise la protéine Lo18 afin de maintenir son intégrité membranaire lors d'un stress BA, des expériences d'immunoblotting ont été réalisées sur des extraits cellulaires provenant de cultures mises en contact ou non avec 60 mM de BA pendant 5 ou 30 min (Figure 56). Un témoin positif qui correspond à la synthèse de Lo18 suite à un choc thermique (30 min à 42°C) a également été réalisé. Il s'agit d'un stress de référence : plusieurs études au laboratoire ont déjà démontré une forte production de Lo18 lors de ce type de stress (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 1994).

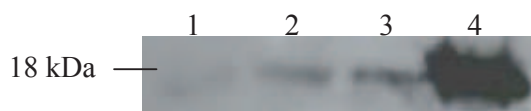


Figure 56 : Immunoblotting montrant la synthèse de la protéine Lo18 en conditions de stress chez *O. oeni* ATCC BAA-1163. Les expériences ont été réalisées sur des cellules de *O. oeni* prélevées en phase exponentielle et cultivées en conditions optimales de croissance (1) puis stressées 5 min (2) ou 30 min (3) avec 60 mM de BA ou 30 min à 42°C (4).

La Figure 56 révèle **la présence de la sHsp Lo18 lors d'un stress BA et d'un stress thermique**. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Coucheney *et al.* (2005) qui ont montré la synthèse de cette sHsp lors de ces deux stress. De plus, ces travaux indiquent que Lo18 est associée avec la membrane plasmique de *O. oeni* lors de ces 2 stress (Coucheney *et al.*, 2005b). Ici, la mise en évidence de la sHsp par détection immunologique suggère un niveau de synthèse de Lo18 bien plus important lors d'un choc thermique que lors d'un choc BA. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le stress thermique agit à la fois sur la membrane bactérienne et sur les protéines cytoplasmiques (Narberhaus, 2002) alors que le stress BA n'a pas ou peu d'action sur les protéines cellulaires. De plus, comme mentionné précédemment, le BA semble altérer la croissance de *O. oeni*, il a donc des effets plus généraux sur la physiologie cellulaire que ceux décrits jusqu'à présent dans la littérature. Au vu de nos résultats, nous pouvons également nous demander si le BA n'aurait pas un impact sur l'efficacité de traduction des protéines qui pourrait alors expliquer la différence de quantité de Lo18 mise en évidence par nos expériences d'immunoblotting lors des deux stress testés. Pour vérifier cette hypothèse, il serait envisageable de mesurer l'incorporation d'acides aminés radioactifs dans les protéines nouvellement synthétisées par *O. oeni*. Par exemple, la méthionine marquée au ^{35}S pourrait être utilisée pour suivre le taux de synthèse protéique en absence et en présence de stress BA et thermique.

Impact de l'ajout de BA sur le transcriptome de *O. oeni*

Afin de déterminer l'impact d'une fluidification membranaire sur l'expression génique de *O. oeni*, une analyse transcriptomique a été réalisée à l'aide de biopuces en présence et en absence de BA. Pour cette étude, réalisée en collaboration avec le Département de Biotechnologie de l'Université de Vérone (E. Stefanelli, G. Felis, S. Toriani), la souche *O. oeni* PSU-1 a été utilisée car son génome est séquencé, assemblé et annoté et car des biopuces permettant la mesure de l'expression génique de

cette souche étaient disponibles. De plus, le laboratoire de Génomique Fonctionnelle de Vérone (A. Ferrarini, P. Tononi) a une bonne expérience dans la préparation des ARNm et le contrôle de leur qualité ainsi que dans la préparation des biopuces et l'analyse statistique de données transcriptomiques.

L'analyse des résultats indique qu'après une incubation de *O. oeni* pendant 5 minutes en présence de 60 mM de BA, aucune modification de la quantité de transcrits n'est observée pour les 1838 gènes présents sur la puce (données non présentées). En revanche, lors d'une incubation de 30 minutes, les taux de transcrits de 66 gènes sont modifiés. En effet, dans cette condition, les taux de transcrits de trois gènes sont diminués, les taux de transcrits de 26 gènes sont augmentés d'un facteur 2 à 3 et ceux de 37 gènes ont un taux de transcrits supérieur à 3. Les gènes différentiellement exprimés ont alors été classés en catégories basées sur la fonction de leur produit suivant une distribution de clusters de groupes orthologues (COG) d'après le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG> (Figure 57) qui est couramment utilisé pour traiter ce type de données.

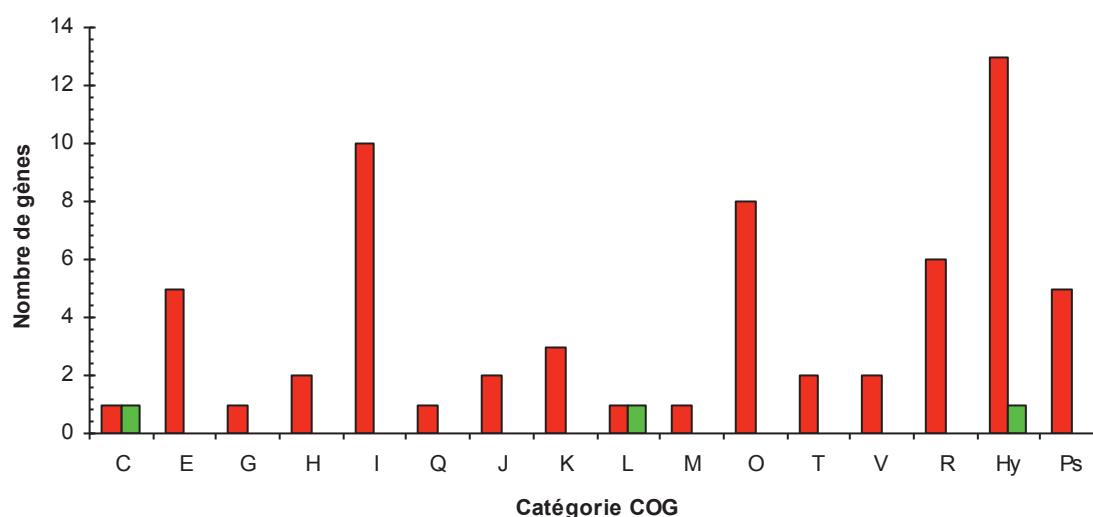


Figure 57 : Classement des gènes de *O. oeni* PSU-1 dont le taux de transcrits varie suite à un stress BA (60 mM) de 30 min suivant la fonction de leur produit (distribution COG). Le nombre de gènes dont le taux de transcrits augmente et diminue est respectivement représenté en rouge et en vert. Les différentes catégories sont C : production et conversion d'énergie, E : transport et métabolisme des acides aminés, G : transport et métabolisme des glucides, H : métabolisme des coenzymes, I : métabolisme des lipides, Q : biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires, J : traduction, structure et biosynthèse des ribosomes, K : transcription, L : réplication de l'ADN, M : biosynthèse de l'enveloppe cellulaire et de la membrane, O : modifications post-transcriptionnelles, turnover protéique, protéines chaperons, T : mécanismes de transduction du signal, V : mécanismes de défense, R : fonction générale prédite uniquement, Hy : protéines hypothétiques, Ps : pseudogènes.

La réponse de *O. oeni* à la présence de BA dans son milieu environnemental se manifeste par une augmentation de la quantité de transcrits pour des gènes dont le produit participe à la réponse au stress. Les données obtenues sont présentées dans le Tableau VII.

Tableau VII : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans la réponse au stress pour des cellules de *O. oeni* PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes.

Locus, annotation	Nom de la protéine	Fonctions	COG	Expression
OEOE_0289, protéine de réponse au stress	Hsp20	Protéine chaperon	O	11,26
OEOE_0513, répresseur transcriptionnel des gènes de classe III	CtsR	Transcription	K	2,57
OEOE_0514, protéine Clp ATPase	ClpC	Protéine chaperon	O	2,88
OEOE_0570, protéine Clp protéase	ClpP	Protéine chaperon	O	5,14
OEOE_0640, protéine Clp ATPase	ClpE	Protéine chaperon	O	5,00
OEOE_1169, protéine de liaison aux nucléotides, famille UspA	UspA	Protéine de stress universelle	T	3,41
OEOE_1308, chaperon moléculaire	DnaJ	Protéine chaperon	O	4,06
OEOE_1309, chaperon moléculaire	DnaK	Protéine chaperon	O	3,98
OEOE_1310, chaperon moléculaire	GrpE	Protéine chaperon	O	3,05
OEOE_1639, isomérase <i>cis-trans</i> peptidyl-prolyl	Cyclophiline A	Modifications post-transcriptionnelles	O	3,98

Huit gènes appartenant à la catégorie COG O (modifications post-transcriptionnelles, turn-over protéique, protéines chaperons) ont un taux de transcrits qui augmente lors du stress BA 60 min. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes codant pour des Hsp comme les sHsp ou les protéines Clp : *hsp20* (correspondant à *hsp18* chez *O. oeni* ATCC BAA-1163) (OEOE_0289), *clpC* (OEOE_0514), *clpP* (OEOE_0570) et *clpE* (OEOE_0640). Les gènes de l'opéron *DnaK* ont également un taux de transcrits qui augmente de manière importante : on distingue *dnaJ* (OEOE_1308), *dnaK* (OEOE_1309) et *grpE* (OEOE_1310) dont l'expression génique est respectivement 4,06, 3,98 et 3,05 fois supérieure à celle de la condition témoin. Ces gènes sont classiquement exprimés lors de stress divers chez les bactéries car ils codent pour des Hsp qui protègent les protéines cellulaires de la dénaturation, assistent à leur repliement ou dissolvent les agrégats protéiques lors de stress (Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). Néanmoins, dans la littérature aucune action du BA n'a été démontrée sur l'agrégation des protéines cellulaires cependant nos travaux ont mis en évidence que la présence de 60 mM de BA perturbe la physiologie cellulaire de *O. oeni* (Figures 52 et 53). Comme cela a déjà été suggéré précédemment, nous pourrions également envisager que le BA altère la synthèse des protéines en formant notamment des protéines tronquées ce qui expliquerait l'augmentation des taux de transcrits des gènes codant pour la machinerie cellulaire impliquée dans la réponse au stress.

Le gène codant pour CtsR, OEOE_0513, qui appartient à la catégorie COG K (transcription) voit également son taux de transcrits augmenté de 2,57 fois en présence de BA. Ce répresseur transcriptionnel est considéré comme le régulateur majeur de l'expression des gènes de réponse au stress chez *O. oeni* (Grandvalet *et al.*, 2005). Le taux de transcrits des gènes OEOE_1169 et OEOE_1639, codant pour des protéines chaperons qui sont respectivement la protéine de stress universelle UspA et la cyclophiline A, est 3,41 et 3,98 fois plus abondant qu'en absence de stress.

Plusieurs gènes participant au métabolisme des acides nucléiques voient leur taux de transcrits modifier lors de la présence de BA (Tableau VIII) : les gènes OEOE_0440 et OEOE_1486 appartiennent à la catégorie COG J qui intervient dans la traduction, la structure et la biosynthèse des

ribosomes et les gènes OE0E_0005 et OE0E_1494 sont regroupés dans la catégorie COG L. Les produits de ces gènes jouent un rôle dans la réplication de l'ADN.

Tableau VIII : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans le métabolisme des acides nucléiques et des protéines pour des cellules de *O. oeni* PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes.

Locus, annotation	Nom de la protéine	Fonctions	COG	Expression
OE0E_0005, gyrase, sous unité B	topoisomérase II	Réplication de l'ADN	L	0,32
OE0E_0440, seryl-tRNA synthétase		Traduction	J	3,69
OE0E_1486, Asp-tRNA ^{Asn} /Glu-tRNA ^{Gln} amidotransférase, sous unité A		Structure et biosynthèse des ribosomes	J	3,23
OE0E_1494, transposase		Réplication de l'ADN	L	4,00

Les données transcriptomiques obtenues révèlent que des gènes codant pour des protéines du métabolisme cellulaire voient leur taux de transcrits varier de 0,42 à 7,45 suite à l'ajout du BA pendant 30 minutes (voir Tableau IX).

Tableau IX : Niveau d'expression des gènes dont le produit est impliqué dans le métabolisme cellulaire pour des cellules de *O. oeni* PSU-1 soumises à un stress BA de 30 minutes.

Locus, annotation	Nom de la protéine	Fonctions	COG	Expression
OE0E_0024, cystéine aminopeptidase	PepC	Métabolisme des acides aminés	E	3,43
OE0E_0043, kéto-stéroïdes isomérase-like		Biosynthèse des stéroïdes	R	2,36
OE0E_0143, histidine kinase	CiaH	Mécanismes de transduction du signal	T	2,99
OE0E_0208, hydrolase		Hydrolase, peptidase	R	2,32
OE0E_0241, hydrolase	Pepl	Hydrolase, thioestérase	R	2,60
OE0E_0368, amidase		Métabolisme secondaire	Q	2,35
OE0E_0438, perméase à peptides		Système de transport type ABC	V	23,90
OE0E_0439, ATPase		Système de transport type ABC	V	3,98
OE0E_0443, perméase à acides aminés branchés		Transport des acides aminés	E	3,22
OE0E_0719, D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase		Biosynthèse du peptidoglycane	M	7,45
OE0E_0720, estérase		Tributyline estérase	R	5,46
OE0E_0863, acyltransférase		Biosynthèse des phospholipides	R	2,63
OE0E_0936, pyruvate oxydase		Métabolisme des coenzymes	H	2,46
OE0E_0939, argininosuccinate synthase		Métabolisme des acides aminés	E	5,28
OE0E_1325, malate déshydrogénase		Cycle du citrate, métabolisme du pyruvate	C	3,00
OE0E_1460, glycérophosphoryl-diester-phosphodiesterase		Production d'énergie	C	0,42
OE0E_1523, 6-phosphogluconate déshydrogénase-like		Voie des pentoses phosphate	G	4,90
OE0E_1584, acétyl-coenzyme A carboxylase	AccD	Biosynthèse des acides gras	I	2,66
OE0E_1585, biotine carboxylase	AccC	Biosynthèse des acides gras	I	3,39
OE0E_1586, 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] déshydratase	FabZ	Biosynthèse des acides gras	I	3,56
OE0E_1587, protéine de transport de biotine-carboxyle	AccB	Biosynthèse des acides gras	I	2,55
OE0E_1588, 3-oxoacyl-3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	FabF	Biosynthèse des acides gras	I	5,25
OE0E_1589, 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	FabG	Biosynthèse des acides gras	I	4,89
OE0E_1590, acyl-carrier-protein S-malonyltransferase	FabD	Biosynthèse des acides gras	I	5,44
OE0E_1591, énoyl-[acyl carrier protein] reductase II	FabK	Biosynthèse des acides gras	R	3,53
OE0E_1592, protéine de transport	AcP	Biosynthèse des acides gras	I	5,22
OE0E_1593, 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	FabH	Biosynthèse des acides gras	I	6,06
OE0E_1594, régulateur transcriptionnel, famille MarR	FabT	Biosynthèse des acides gras, transcription	K	6,11
OE0E_1595, 3R-hydroxymyristoyl ACP déshydratase	FabM	Biosynthèse des acides gras	I	6,06
OE0E_1596, répresseur de l'opéron biotine	HTH11	Métabolisme des vitamines et des cofacteurs	H	2,46
OE0E_1618, transporteur de dipeptide/oligopeptide/nickel de type ABC		ABC transporteurs membranaires	E	3,85
OE0E_1619, transporteur de dipeptide/oligopeptide/nickel de type ABC		ABC transporteurs membranaires	E	3,61
OE0E_1710, régulateur transcriptionnel	TetR_N	Transcription	K	4,80

Les gènes participant au métabolisme cellulaire de *O. oeni* PSU-1 exprimés lors d'un stress BA appartiennent à différentes catégories COG. Les gènes OE0E_1325, OE0E_1460, codant respectivement pour la malate déshydrogénase et une phosphodiesterase appartiennent à la catégorie COG C : leurs produits sont impliqués dans la production et la conversion d'énergie. De plus, 5 gènes appartenant à la catégorie COG E ont un taux de transcrits qui augmente fortement par rapport à la condition témoin : il s'agit des gènes OE0E_0024, OE0E_0443, OE0E_0939, OE0E_1618 et OE0E_1619 dont le produit participe au transport et au métabolisme des acides aminés. Le produit du gène OE0E_1523 est quant à lui impliqué dans le métabolisme des glucides, plus particulièrement

dans la voie des pentoses phosphate (catégorie COG G). Le gène OEEOE_0936 et le gène OEEOE_1596 appartiennent à la catégorie COG H et codent respectivement pour la pyruvate oxydase et pour le répresseur de l'opéron biotine. On retrouve aussi le gène codant pour le régulateur TetR (OEEOE_1710) dont le taux de transcrits augmente d'un facteur 4,8 en présence de BA. Les produits des gènes suivants OEEOE_0719, OEEOE_0043 et OEEOE_0863 participent respectivement à la synthèse du peptidoglycane (COG M), des kétostéroïdes (COG R) et des glycérophospholipides (COG R). De plus, **une de ces catégories nous intéresse plus particulièrement : il s'agit de celle impliquée dans le métabolisme des lipides (COG I). Dix gènes appartenant à cette catégorie voient leur niveau de transcription augmenter de manière importante en réponse au stress BA 30 min : OEEOE_1584, OEEOE_1585, OEEOE_1586, OEEOE_1587, OEEOE_1588, OEEOE_1589, OEEOE_1590, OEEOE_1592, OEEOE_1593 et OEEOE_1595.** Tous ces gènes, ainsi que *fabK* (OEEOE_1591, COG R) et *fabT* (OEEOE_1594, COG K) appartiennent au cluster Fab qui permet la synthèse des acides gras. Des alignements de séquences ont révélé que le cluster Fab de *O. oeni* est organisé de la même façon que celui de *Streptococcus pneumoniae*. La Figure 58 compare ce cluster chez ces deux microorganismes.

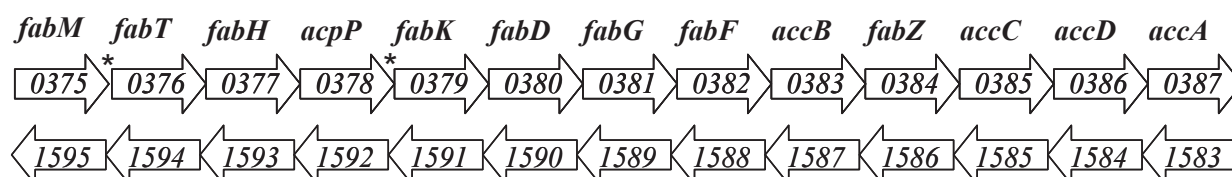


Figure 58 : Comparaison de l'organisation des clusters Fab chez *S. pneumoniae* D39 (Lu et Rock, 2006) et *O. oeni* PSU-1. Les astérisques indiquent la localisation des séquences palindromiques nécessaires à la fixation du régulateur transcriptionnel FabT chez *S. pneumoniae*.

Chez *S. pneumoniae*, la régulation de l'expression de ce cluster est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel FabT qui se fixe dans la région promotrice des gènes *fabT* et *fabK* (Lu & Rock, 2006). Les séquences consensus de fixation de FabT pour ces deux gènes sont respectivement GTTTTGATTGTAAGT et AGTTTGACTGTCAAATT. Chez *O. oeni*, la position des sites de fixation de FabT n'est pas encore connue. Une première analyse de séquence a été réalisée mais n'a pas encore permis de les identifier. Ce répresseur transcriptionnel appartient à la famille des régulateurs de type MarR qui permettent entre autres la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress, la virulence ou la résistance aux antibiotiques (Perera & Grove, 2010).

Afin de valider les résultats obtenus par la méthode des biopuces, des expériences de RT-qPCR ont également été réalisées sur les gènes du cluster Fab de *O. oeni* PSU-1 suite à un stress BA 5 et 30 min. Ainsi les modifications d'expression des gènes de ce cluster ont pu être confirmées (données non présentées). De plus, la technique de RT-qPCR a été utilisée pour déterminer le niveau d'expression des gènes du cluster Fab chez la souche de *O. oeni* ATCC BAA-1163. Cette expérience nous a permis d'identifier deux gènes non séquencés dans les bases de données codant respectivement pour les protéines AccB et FabZ : ces gènes se situent entre les contigs n°43 et n°20. Ces 2 gènes ont été

séquencés et leur séquence respective sera déposée dans les bases de données prochainement. Les résultats obtenus par RT-qPCR indiquent que le taux de transcrits des gènes du cluster Fab présente le même ordre de grandeur chez les deux souches de *O. oeni* étudiées PSU-1 et ATCC BAA-1163 (données non présentées) lors d'un stress BA de 5 ou 30 min.

Pour finir, le taux de transcrits de 14 gènes codant pour des protéines hypothétiques (Hy) et 5 pseudogènes (Ps) est modifié suite à l'ajout de BA (Tableau X). Actuellement, aucune information concernant la fonctionnalité des protéines codées par ces gènes n'est disponible mais il est envisageable qu'elles possèdent de nouveaux rôles physiologiques impliqués dans la réponse adaptative de *O. oeni* lors d'une fluidification membranaire.

Tableau X : Niveau d'expression des gènes codant pour des protéines hypothétiques et des pseudogènes pour des cellules de *O. oeni* PSU-1 soumises à un stress BA de 30 min.

Locus, annotation	COG	Expression
OEOE_0123, protéine hypothétique	Hy	2,31
OEOE_0240, protéine hypothétique	Hy	5,78
OEOE_0377, protéine hypothétique	Hy	2,39
OEOE_0593, protéine hypothétique	Hy	0,49
OEOE_0639, protéine hypothétique	Hy	2,54
OEOE_0691, protéine hypothétique	Hy	2,23
OEOE_0715, protéine hypothétique	Hy	3,76
OEOE_0718, protéine hypothétique	Hy	2,42
OEOE_0721, protéine hypothétique	Hy	4,29
OEOE_0725, protéine hypothétique	Hy	2,47
OEOE_1492, protéine hypothétique	Hy	2,58
OEOE_1493, protéine hypothétique	Hy	2,27
OEOE_1525, protéine hypothétique	Hy	2,38
OEOE_1535, protéine hypothétique	Hy	2,43
pseudo_OEOE_0211_936_35	Ps	2,56
pseudo_OEOE_0360_305_40	Ps	2,48
pseudo_OEOE_0940_934_40	Ps	3,84
pseudo_OEOE_1042_389_35	Ps	2,17
pseudo_OEOE_1713_846_40	Ps	3,03

L'ensemble des données obtenues lors de cette étude transcriptomique a montré que les produits des gènes utilisés par *O. oeni* en réponse au stress BA participent à différents processus cellulaires. Concernant le métabolisme bactérien, plusieurs voies de biosynthèse semblent être sollicitées en réponse à ce stress fluidifiant la membrane ; la Figure 59 représente ces différentes voies.

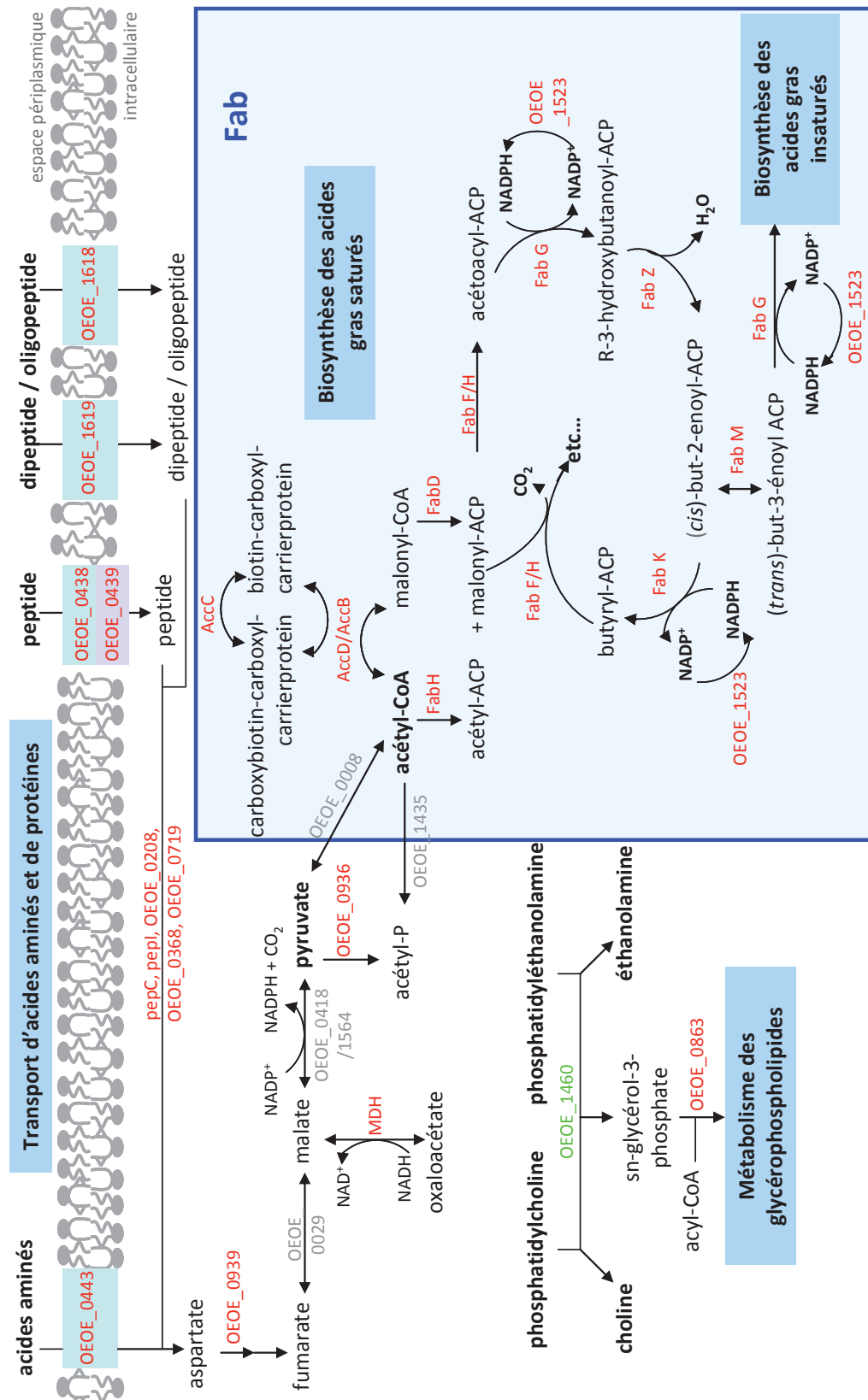


Figure 59 : Voies de biosynthèse de *O. oeni* PSU-1 activées suite à un stress BA de 30 min. Les produits des gènes dont le taux de transcrits est augmenté ou non en présence de BA sont indiqués respectivement en rouge et en gris. La nomenclature utilisée est la suivante : lorsque le gène codant pour ces protéines n'a pas été identifié, EC xxxx indique la classification numérique des enzymes ; OEOE_xxxx indique l'appellation des gènes dans les bases de données et est parfois précédé du nom de la protéine.

La Figure 59 indique que trois voies principales sont activées en réponse à un stress BA de 30 min : on distingue celles de la biosynthèse des acides gras saturés et insaturés et celle du métabolisme des glycérophospholipides. Ces trois voies permettent la synthèse d'acides gras ou de phospholipides qui pourraient être intégrés à la membrane cytoplasmique de *O. oeni* afin de réguler l'augmentation de fluidité causée par le BA. Cependant, malgré l'augmentation du taux de transcrits des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces voies métaboliques, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de composition en acides gras membranaires mis à part l'apparition d'un nouveau composé (Figure 55). Ce composé est également présent en quantité plus importante lors d'un stress BA de 5 min alors que notre étude transcriptomique n'a révélé aucune modification des taux de transcrits des gènes étudiés (données non présentées). Il est alors possible d'envisager que le composé inconnu pourrait provenir de la dégradation d'acides gras initialement présent dans la membrane cytoplasmique de *O. oeni*.

L'absence de nouveaux composés lipidiques membranaires pourrait s'expliquer par le fait que la biosynthèse d'acides gras membranaires est un processus long et coûteux en énergie pour les cellules. Il est donc probable que les durées d'application des stress BA utilisées soient insuffisantes pour que *O. oeni* synthétise de nouveaux acides gras. Cette hypothèse semble appuyée par d'autres expériences de chromatographie en phase gazeuse que nous avons réalisées. En effet, il apparaît qu'un stress éthanol 8% (v/v) de 30 min abouti strictement au même spectre d'acides gras qu'en absence de stress (données non présentées) alors qu'une modification importante de la composition en acides gras membranaires est obtenue après 36 h de contact avec l'éthanol (Article II). Nous pourrions alors envisager d'étudier de nouveau la composition en acides gras membranaires de *O. oeni* lors de stress BA ayant des durées d'application plus importantes.

De plus, nous avons observé que la concentration de BA utilisée (60 mM) inhibe la croissance bactérienne (Figure 53) révélant ainsi que ce composé, que nous avons utilisé comme un outil pour fluidifier la membrane plasmique de *O. oeni*, a des effets importants sur la physiologie des cellules. Il serait alors possible d'envisager qu'il ralentisse ou qu'il altère la synthèse des protéines cellulaires expliquant ainsi l'absence de modification du contenu en lipides membranaires. Dans ce cas, l'absence de modification du contenu en acides gras membranaires serait due à un effet indirect du BA sur la synthèse protéique. Cette hypothèse semble appuyée (i) par nos expériences d'immunoblotting qui indiquent une quantité moindre de Lo18 en comparaison avec le stress thermique (Figure 56) et (ii) par l'augmentation du taux de transcrits des gènes codant pour les protéines chaperons (Clp, opéron DnaK, Hsp20, UspA) mis en évidence lors de notre étude transcriptomique (Tableau VII).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans leurs habitats naturels, les microorganismes se développent rarement dans leurs conditions optimales de croissance : ils sont souvent dans un état physiologique que l'on peut qualifier de stress. Les conditions environnementales défavorables ont alors des effets néfastes sur les protéines cytoplasmiques et la membrane cellulaire des microorganismes. Or, il est capital pour ces cellules de conserver l'intégrité de leur membrane cytoplasmique qui constitue leur première barrière contre le stress. Le vin, qui est un milieu particulièrement stressant notamment du fait de sa teneur en éthanol importante, de son pH faible et de ses nombreuses carences nutritionnelles, constitue un très bon modèle d'étude pour la réponse au stress chez les bactéries (Alexandre *et al.*, 2004; Alexandre *et al.*, 2008; Lonvaud-Funel, 1999). *Oenococcus oeni* est la principale bactérie responsable de la fermentation malolactique des vins et son adaptation à ce milieu hostile nécessite de préserver l'intégrité de sa membrane. Un des objectifs de cette thèse était donc d'étudier la réponse globale de *O. oeni* suite à un stress modifiant sa fluidité membranaire. Une des composantes de la réponse adaptative aux stress de *O. oeni* est la production de la protéine Lo18 qui a fait l'objet de nombreuses études au laboratoire. Néanmoins, à ce jour, l'association entre Lo18 et la membrane plasmique reste relativement mal connue. Elle a donc été étudiée pendant ce travail de thèse.

1. Réponse de *O. oeni* à des stress fluidifiant sa membrane cytoplasmique

La membrane cellulaire des microorganismes étant un élément important pour leur survie il nous est donc apparu primordial dès le début de ce travail d'étudier la réponse de *O. oeni* à un stress fluidifiant la membrane. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser deux stress différents qui sont l'ajout d'alcool benzylique (BA) ou d'éthanol dans le milieu de culture de la bactérie *O. oeni*. Tout d'abord, la technique d'anisotropie de fluorescence a permis de montrer que la présence de 60 mM de BA provoque une fluidification importante et transitoire de la membrane plasmique de *O. oeni*. Des études plus approfondies sur l'intégrité membranaire lors de ce stress pourraient être envisagées notamment en utilisant la cytométrie en flux. L'iodure de propidium (IP) pourrait alors être utilisé comme fluorochrome car cet agent intercalant pénètre dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Nous aurions ainsi une idée de l'impact de la fluidité membranaire engendrée par le BA sur l'intégrité membranaire de *O. oeni*. Dans nos conditions expérimentales, cet agent fluidifiant a des impacts importants sur la physiologie cellulaire de *O. oeni*. En effet, il inhibe la croissance bactérienne et altère l'activité enzymatique des H⁺-ATPases qui sont des protéines enchâssées dans la membrane plasmique (Résultats, Chapitre III). D'après les résultats que nous avons obtenu par l'étude transcriptomique et par les expériences d'immunoblotting, nous avons également suggéré que le BA pourrait avoir un effet sur le taux de traduction et sur la qualité des protéines produites lors de ce stress (Résultats, Chapitre III).

Au vu des effets importants du BA sur la physiologie de *O. oeni*, nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires utilisés par cette bactérie lactique pour réguler sa fluidité membranaire. Dans un premier temps, les résultats obtenus par la technique des biopuces indiquent l'activation de nombreux gènes de stress dès 30 minutes de stress BA. Nous pouvons par exemple citer ceux codant pour le système DnaKJE, les protéines Clp ou encore la sHsp Lo18 (Chapitre Résultats, Partie III). Ces résultats sont en accord avec la littérature car plusieurs études relatent que le stress BA induit l'expression de gènes codant pour des protéines chaperons telles que le système GroESL chez *E. coli* (De Marco *et al.*, 2005), DnaK chez *Salmonella typhimurium* (Porta *et al.*, 2010) ou encore Hsp17 chez *Synechocystis* (Horvath *et al.*, 1998). Ces résultats peuvent signifier que ces protéines de stress pourraient participer au maintien de l'intégrité des membranes bactériennes lors de stress. En effet, des travaux réalisés chez les eucaryotes révèlent l'association de la machinerie cellulaire KJE (système Hsp70) avec des lipides (Kirkegaard *et al.*, 2010). Afin de mettre en évidence les protéines participant à la régulation de l'intégrité membranaire, nous pourrions envisager une étude de protéomique comparative par électrophorèse bidimensionnelle sur les protéines en association avec la membrane plasmique de *O. oeni* suite à des stress modifiant la fluidité membranaire. Cette technique pourrait permettre d'identifier d'autres partenaires que ceux déjà identifiés dans la littérature ayant un rôle dans la stabilisation de la fluidité membranaire.

En présence d'un stress BA de 30 minutes, les résultats des biopuces indiquent également une augmentation importante du taux de transcrits des gènes du cluster Fab dont les produits interviennent dans la synthèse des acides gras membranaires. Ces données nous ont amené à nous intéresser à la composition lipidique de la membrane cytoplasmique de *O. oeni* lors de stress. La technique de chromatographie en phase gazeuse n'a pas permis de mettre en évidence de différence au sein du contenu membranaire en acides gras lors de 30 min de stress BA (Résultats, Chapitre III). Des résultats identiques ont été obtenus en présence d'éthanol 8% (v/v), un autre stress fluidifiant la bicouche qui est cette fois-ci couramment rencontré par *O. oeni* dans le milieu vin (données non présentées). Néanmoins, après 36 h de stress éthanol la composition en acides gras membranaires varie considérablement (Article II). Ces résultats indiquent que l'augmentation du taux d'acides gras saturés et cycliques ainsi que la diminution d'acides gras insaturés sont des mécanismes longs à mettre en place et qu'ils permettent à *O. oeni* de moduler la fluidité de sa membrane plasmique. Ce travail de thèse indique aussi que *O. oeni* utilise ces types de changements en réponse à différents stress cellulaires comme le stress acide ou lors de la phase stationnaire de croissance (Chapitre II, résultats complémentaires). Ces données sont en accord avec la bibliographie où il a été démontré, et ce à de nombreuses reprises, que la modification du lipidome membranaire est couramment utilisée afin de contrecarrer les effets délétères des conditions environnementales sur la fluidité membranaire (Cronan, 2002; Denich *et al.*, 2003; Weber & De Bont, 1996).

Nos expériences de RT-qPCR révèlent également que le gène de réponse au stress *hsp18* est employé par *O. oeni* dans les phases précoces et tardives du stress éthanol (Article II). Ces résultats ont contribué à l'élaboration d'un modèle qui constitue la première démonstration claire de la réponse au stress de *O. oeni* de manière chronologique. Chez *Synechocystis*, la régulation de la fluidité membranaire fait intervenir l'association des Hsp GroESL et Hsp17 avec les membranes thylakoïdiennes (Horvath *et al.*, 2012; Vigh *et al.*, 2007a). Les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'ordre moléculaire de la bicouche engendrée par l'action des Hsp pourrait alors réguler négativement l'expression des gènes de stress par un mécanisme qui reste pour l'instant non identifié (Tsvetkova *et al.*, 2002; Vigh *et al.*, 2007a). Nous pourrions alors envisager la même hypothèse chez *O. oeni* : suite à un stress, le retour à l'état de fluidité optimal de la membrane pourrait induire un arrêt de la transcription des gènes de réponse au stress. Cette hypothèse expliquerait alors la diminution du taux d'induction du gène *hsp18* observée au cours du temps (Article II). Un autre aspect concernant *hsp18* reste encore à élucider : il s'agit de la régulation de son expression. A l'heure actuelle, nous savons qu'en amont de ce gène se situent deux sites putatifs de fixation du régulateur transcriptionnel CtsR. Chez *O. oeni*, ce répresseur semble être le régulateur central de l'expression des gènes de réponse au stress (Grandvalet *et al.*, 2005) mais nous ne connaissons toujours pas le mécanisme permettant la levée de la répression de ces gènes en condition de stress. Un obstacle majeur à la réalisation de ce travail est le génome de *O. oeni* qui est difficilement manipulable. Plusieurs études sont actuellement en cours au laboratoire afin d'obtenir des souches mutées pour les gènes de réponse au stress dans le but d'apporter des éléments de réponse sur la régulation de l'expression de ces gènes.

Concernant le modèle proposé pour la réponse au stress éthanol de *O. oeni*, une question persiste : comment le signal de la perturbation de la fluidité membranaire est-il transmis de la bicouche lipidique au génome ? Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur cette problématique. Néanmoins, il est envisageable que *O. oeni* utilise des systèmes composés de senseurs et de régulateurs, comme les systèmes à deux composants, pour la perception et la transduction des signaux extracellulaires. En effet, la bibliographie indique que lors d'un stress froid, qui a un effet rigidifiant sur les membranes, *Synechocystis* utilise une voie de transduction du signal composée de plusieurs partenaires. Dans un premier temps Hik33, qui est une histidine kinase membranaire, va détecter les variations de fluidité de la membrane. Par le biais d'une phosphorylation, elle active une autre histidine kinase soluble nommée Hik19 qui transmet à son tour ce groupement phosphate au régulateur transcriptionnel Rer1. Celui-ci se fixe alors sur les séquences promotrices du gène *desB* codant pour une désaturase afin de réguler son expression (Suzuki *et al.*, 2000). L'analyse du génome de *O. oeni* révèle la présence de sept systèmes à deux composants, nous pourrions alors envisager leur utilisation dans la transmission de l'information lors d'une fluidification membranaire. En effet, deux gènes codant pour des histidines kinases voient leur taux de transcrits augmentés dans l'étude transcriptomique réalisée lors d'un stress BA de 30 min : il s'agit des gènes *OEOE_0143* et *OEOE_0725* (Résultats, Chapitre III). Pour

confirmer cette hypothèse, nous pourrions envisager d'étudier les interactions éventuelles qui s'établissent entre les différents membres de ces systèmes à deux composants lors d'un stress BA. La technique de transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (FRET) ou la technique de double hydride pourraient être employées. Néanmoins, ces études devront être réalisées chez d'autres modèles bactériens où la génétique microbienne serait plus accessible que chez *O. oeni* comme par exemple chez *Bacillus subtilis* ou *Lactobacillus plantarum*.

2. Interaction de Lo18 avec la membrane plasmique de *O. oeni*

La synthèse de la protéine de stress Lo18 semble être un élément important dans la réponse au stress chez *O. oeni*. En effet, cette sHsp permet une meilleure survie de *O. oeni* dans le vin, son habitat naturel, et semble participer au bon déroulement de l'activité malolactique (Coucheney *et al.*, 2005a). La majeure partie de ma thèse a donc consisté en la caractérisation de cette protéine produite en réponse à de multiples stress (Coucheney *et al.*, 2005b; Guzzo *et al.*, 1997; Guzzo *et al.*, 1998; Guzzo *et al.*, 2000). Des études préalablement réalisées au laboratoire ont mis en évidence une double localisation cellulaire de Lo18 : cette protéine est à la fois localisée dans le cytoplasme où elle exerce une activité de chaperon moléculaire mais elle est également retrouvée en interaction avec la membrane plasmique de *O. oeni* lors de stress (Coucheney *et al.*, 2005b; Delmas *et al.*, 2001; Jobin *et al.*, 1997). En particulier, il a été montré que plus l'intensité du stress est importante, plus la localisation de Lo18 dans la fraction membranaire est élevée (Coucheney *et al.*, 2005b). Un des éléments clés de cette thèse était alors de caractériser la relation existant entre Lo18 et la membrane plasmique de *O. oeni*.

La protéine Lo18 joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité membranaire. D'après nos expériences d'anisotropie de fluorescence cette sHsp est capable de stabiliser la fluidité de liposomes obtenus à partir de phospholipides extraits de la membrane plasmique de *O. oeni* pour une température supérieure à 31°C (Articles I et II) (ces vésicules lipidiques pouvant être considérées comme des membranes modèles car leur composition en acide gras est très proche de celle de la membrane plasmique de *O. oeni* (Article II)). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus au laboratoire par Coucheney et ses collaborateurs (2005). Le modèle d'action de Lo18 en réponse à un stress éthanol, présenté dans l'Article II, indique que dès les premières phases du stress cette sHsp va préférentiellement s'associer avec la membrane cytoplasmique de *O. oeni*. De plus, il s'avère que la stabilisation des liposomes est conditionnée par la structure oligomérique de Lo18. En effet, l'activité lipochaperon optimale est obtenue à pH 7 lorsque Lo18 possède une dynamique d'oligomérisation importante (Article I). Ces données nous ont donc amené à nous questionner sur la forme oligomérique de Lo18 qui est en association avec les phospholipides. Pour ce faire, des expériences de cross-linking au BS³ en présence de liposomes-contrôle et -éthanol suivies d'immunoblotting ont été

réalisées (Article II). Les données obtenues indiquent que l'association de Lo18 avec des bicouches lipidiques est un processus dynamique qui dépend directement de la composition en phospholipides. De plus, ce processus est en faveur d'une forme dimérique de Lo18 lorsque celle-ci est en présence de liposomes-contrôle. Plusieurs études indiquent également la nécessité d'une réorganisation tridimensionnelle des sHsp pour une interaction membranaire chez d'autres microorganismes. Ainsi, il s'avère que Hsp16.3 de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2005) et Hsp17 de *Synechocystis* (Balogi *et al.*, 2008; Tsvetkova *et al.*, 2002) sont présentes à la membrane sous forme dimérique.

La protéine Lo18 est une protéine à caractère hydrophile qui ne présente pas de séquence signal lui permettant de s'intégrer dans des bicouches lipidiques qui sont très hydrophobes. L'association entre cette sHsp et la membrane cytoplasmique reste donc obscure. Des travaux précédemment réalisés au laboratoire suggèrent néanmoins une association périphérique entre Lo18 et les lipides (Jobin *et al.*, 1997). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues pour la protéine α -cristalline humaine où une interaction limitée à la surface de la membrane du cristallin a été montrée (Zhang *et al.*, 1999). Au contraire, Hsp17 exerce son activité de régulation de la fluidité membranaire lorsque cette sHsp s'insère dans la bicouche lipidique (Balogi *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2012). Pour vérifier si Lo18 reste à la périphérie de la membrane, une digestion à la protéinase K pourrait être envisagée comme cela a été réalisé pour GroEL en association avec des lipides synthétiques (Torok *et al.*, 1997). Il serait également possible d'utiliser la technique de la balance de Langmuir ; cette technique a été utilisée pour démontrer que Hsp17 est enchâssée dans la membrane. Récemment, une collaboration avec l'Institut Carnot de Dijon a permis d'obtenir des résultats encourageants sur l'interaction de Lo18 avec des substrats lipidiques en utilisant la microscopie à force atomique haute vitesse (HS-AFM) (données non présentées). Cette technique semble être un bon outil pour étudier l'association entre les sHsp et les lipides, nous pourrions alors envisager son utilisation pour déterminer si l'association de Lo18 avec la membrane de *O. oeni* se fait de manière périphérique.

De plus, nous pourrions envisager l'implication de la partie N-terminale de Lo18 sHsp dans cette interaction. En effet, compte tenu de son hydrophobicité importante cette région pourrait s'insérer dans la bicouche lipidique. Concernant les régions des sHsp entrant en contact avec les lipides, la littérature révèle un désaccord entre les auteurs. En effet, Zhang et ses collaborateurs décrivent qu'une suppression de 35 acides aminés dans la partie N-terminale de Hsp16.3 n'altère pas l'association de cette sHsp avec la membrane de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2005). Au contraire, des mutations ponctuelles générées dans la partie N-terminale de Hsp17 de *Synechocystis* affectent sa répartition cytoplasme/membrane et son interaction avec les lipides (Balogi *et al.*, 2008). Ainsi les propriétés fonctionnelles des sHsp semblent dépendre de la sHsp considérée, il serait donc intéressant de comprendre ce mode de fonctionnement chez Lo18. Pour ce faire, nous disposons au laboratoire de deux constructions permettant la surexpression de protéines Lo18 tronquées : l'une de 27 acides

aminés du côté N-terminal, la seconde de 11 acides aminés dans la partie C-terminale (Ronez, 2012). Néanmoins, malgré une surproduction importante de ces sHsp modifiées chez *E. coli*, les protocoles de purification testés n'ont pas encore permis d'obtenir ces protéines pures en quantité suffisante (données non présentées). Une perspective importante de ce travail serait de mettre au point un protocole de purification pour ces protéines afin de pouvoir étudier l'implication des parties N- et C-terminales de Lo18 dans les activités chaperons de cette protéine que ce soit sur substrats lipidiques ou protéiques.

De nombreux auteurs ont remarqué la préférence des sHsp pour certains substrats lipidiques (Torok *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002). Par exemple, chez *Synechocystis*, Hsp17 interagit principalement avec le MGlcDG, un lipide composé d'acides gras à chaînes carbonées hautement saturées et synthétisé par la MGlcDG synthase. Cette protéine enchâssée dans les membranes thylakoïdiennes de *Synechocystis* est activée dans les premières phases du stress lors d'une modification de la fluidité membranaire (Horvath *et al.*, 2012). D'après les résultats présentés dans l'Article II, il apparaît que l'interaction entre Lo18 et la membrane ainsi que son oligomérisation varient en fonction de la composition en acides gras de la bicouche. Nous pouvons alors envisager l'existence d'acides gras cibles voire la présence de rafts lipidiques qui favoriseraient l'association de Lo18 avec la membrane. Néanmoins, nos expériences d'anisotropie de fluorescence réalisées sur des liposomes synthétiques n'ont pas permis de mettre en évidence de spécificité de substrats pour Lo18 (Chapitre II, résultats complémentaires). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les conditions expérimentales utilisées ne sont pas assez proches du contexte cellulaire de *O. oeni* dans son habitat naturel. Pour confirmer une éventuelle spécificité d'action de Lo18 envers certains substrats lipidiques, il faudrait tester d'autres phospholipides par exemple en utilisant la technique de la balance de Langmuir. En effet, cette technique permettrait d'étudier les interactions qui s'établissent entre Lo18 et des monocouches lipidiques par mesure de la pression de surface. De plus, l'influence de Lo18 sur l'ordre moléculaire des lipides pourrait être caractérisée par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qui permet notamment de déterminer les températures de transition de phase T_M et T_{LH} en suivant les changements de fréquence des groupements CH_2 .

Ce travail de thèse indique également que la sHsp Lo18 semble avoir une préférence pour les substrats lipidiques plutôt que protéiques car la présence de liposomes altère de manière importante l'activité chaperon de Lo18 sur des substrats protéiques en cours de dénaturation (Article II). Ces résultats sont en accord avec ceux de Torok et ses collaborateurs (2001) qui ont décrit qu'en présence de vésicules lipidiques réalisées à partir de membranes de *Synechocystis*, Hsp17 replie moins efficacement la malate déshydrogénase dénaturée thermiquement. Les auteurs suggèrent alors que Hsp17 agit d'abord comme un stabilisateur de membranes avant d'être une protéine chaperon. La même hypothèse a été envisagée pour Lo18 et a permis de construire le modèle de réponse au stress éthanol chez *O. oeni*

(Article II) : Lo18 agit dans un premier temps avec la membrane plasmique afin de stabiliser la fluidité membranaire de *O. oeni* puis exerce ensuite son rôle de chaperon moléculaire sur les protéines cytoplasmiques.

3. Activité chaperon et assemblage multimérique de Lo18

Lors de stress, les protéines cellulaires peuvent perdre leur structure native ce qui conduit parfois à leur agrégation. Les protéines chaperon peuvent alors prendre en charge ces substrats en cours de dénaturation afin de limiter leur agrégation (Basha *et al.*, 2011; Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). Dans le cas de Lo18, une action de protection des protéines cytoplasmiques ATP-indépendante a été montrée ultérieurement au laboratoire sur des protéines cytoplasmiques comme la citrate synthase et la lactate déshydrogénase (Delmas *et al.*, 2001; Weidmann *et al.*, 2010). De plus, ce travail de thèse indique que l'activité chaperon de Lo18 est optimale lorsque cette sHsp est présente dans un mélange de formes oligomériques (Article I). Ces résultats sont en accord avec la bibliographie révélant ainsi la nécessité d'une dynamique d'oligomérisation permettant probablement une réorganisation structurale de Lo18 autour du substrat en cours de dénaturation (Nakamoto & Vigh, 2007; Narberhaus, 2002; Sun & MacRae, 2005a). Cette hypothèse est également soutenue par nos données qui indiquent une perte d'activité de Lo18 à pH 5 probablement due à la perte de sa dynamique d'oligomérisation (Article I). D'autre part, nous savons que Lo18 n'a pas la capacité de replier les protéines dénaturées dans une conformation active, on peut alors supposer que Lo18 transfère ces substrats à d'autres protéines de réponse au stress comme les protéines Clp ou les chaperons universels. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les interactions entre Lo18 et d'autres protéines de stress soit par immunoprécipitation soit par la méthode du double hybride.

De nombreux auteurs décrivent que la structure oligomérique des sHsp ainsi que leur dynamique d'oligomérisation sont primordiales pour le bon déroulement de leurs activités. Des techniques de cross-linking au BS³ ou au formaldéhyde réalisées au laboratoire sur Lo18 ont révélé que cette sHsp est capable de s'organiser en différentes structures oligomériques que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Delmas *et al.*, 2001; Weidmann *et al.*, 2010). Au vu de ces résultats, il nous est donc apparu important de caractériser plus en détail l'oligomérisation de Lo18. Dans un premier temps, les structures oligomériques de Lo18 ont été évaluées par chromatographie d'exclusion puis par ultracentrifugation analytique lors d'une gamme de pH allant de 5 à 9 (Article I). Les données obtenues ont mis en évidence qu'une augmentation du pH induit la dissociation de Lo18 ainsi qu'une hétérogénéité de taille des échantillons. Ensuite, la microscopie électronique nous a permis d'obtenir une image à basse résolution de l'organisation spatiale de Lo18 à pH 5 (Article I). La structure obtenue indique que cette sHsp s'oligomérisse sous la forme de deux anneaux superposés composés de

huit monomères chacun et dont le dimère est probablement la structure de base. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui révèle que de nombreuses sHsp s'organisent en complexes oligomériques sphériques possédant une cavité centrale (Haslbeck *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 1998b; van Montfort *et al.*, 2001). En particulier, la protéine Hsp16.5 de *M. jannaschii*, qui est la seule sHsp procaryote dont la structure a été déterminée aux rayons X, s'organise sous forme d'un complexe de 24 sous-unités dont l'unité structurale de base est un dimère (Kim *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998b). Cette structure dimérique se superpose avec un coefficient de corrélation > à 81% avec l'enveloppe tridimensionnelle de Lo18 obtenue par microscopie électronique (Article I). De plus, la comparaison des structures primaires de ces deux sHsp indique qu'elles possèdent 54% de similarité et 26% d'identité au sein de leur domaine α -cristallin. Elles présentent également une prédiction de structure secondaire très similaire (Article I). La structure tridimensionnelle de Lo18 proposée révèle également la présence de deux structures apicales de densité mal définie (Article I). L'hypothèse alors avancée pour expliquer ces structures suggère qu'elles pourraient correspondre aux parties N-terminale des monomères de Lo18 qui s'organiseraient au centre de la structure oligomérique. En effet, une organisation similaire a déjà été décrite par Koteiche et ses collaborateurs pour Hsp16.5 : ces travaux indiquent que les parties N-terminale des différents oligomères de cette sHsp pointent au centre de la structure tridimensionnelle formée par Hsp16.5 (Koteiche *et al.*, 2005). La structure de Lo18 obtenue pourrait alors correspondre à une forme de réserve de cette sHsp qui s'organise sous forme d'un oligomère inactif fermé. Pour son activation, des réarrangements structuraux pourraient être envisagés comme par exemple une dissociation de l'oligomère de Lo18 suivie d'une réassociation autour de ces substrats comme cela a été proposé dans le modèle d'action des sHp par Lentze *et al.* (2004).

L'obtention de la structure tridimensionnelle de Lo18 constitue un des résultats marquants de ce travail de thèse. Cependant nous pourrions obtenir une idée encore plus précise de son organisation spatiale avec une étude cristallographique de Lo18 qui nous permettrait d'obtenir une image haute résolution de son assemblage multimérique. Ce projet a déjà été initié avec l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Des cristaux de Lo18 ont été obtenus, néanmoins, ils sont très fragiles et ne diffractent pas les rayons X (données non présentées). Une hypothèse peut être envisagée pour expliquer ces résultats : la sHsp Lo18 étant purifiée sous forme d'une protéine native et d'une protéine tronquée de 27 acides aminés dans sa région N-terminale (Matériels et Méthodes, Chapitre II) il est possible que ce mélange de formes aboutisse à la formation de cristaux peu stables. La démarche envisagée pour palier à la présence simultanée de ces 2 formes a été d'obtenir une protéine Lo18 délétée de sa partie N-terminale (Ronez, 2012). Cependant, comme précisé précédemment, un autre problème s'expose à nous : les différents protocoles de purification testés n'ont pas encore permis d'aboutir à l'obtention de la protéine purifiée (données non présentées). Une nouvelle stratégie de purification pourrait alors être envisagée par exemple en utilisant une queue histidine qui augmenterait le rendement de purification.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de mettre en place des collaborations et d'optimiser des outils permettant (i) de caractériser la structure tridimensionnelle de Lo18, (ii) de mieux appréhender l'association de Lo18 avec la membrane plasmique de *O. oeni* et (iii) d'étudier la réponse adaptative de *O. oeni* aux stress environnementaux. L'ensemble des technologies utilisées a contribué à augmenter les connaissances sur la réponse au stress chez les bactéries lactiques et en particulier chez *O. oeni*. A terme, la compréhension des mécanismes d'adaptation de cette bactérie à son environnement pourra permettre l'optimisation de production des ferments lactiques utilisés lors de la fermentation malolactique des vins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abgar, S., Yevlampieva, N., Aerts, T., Vanhoudt, J. & Clauwaert, J. (2000).** Chaperone-like activity of bovine lens alpha-crystallin in the presence of dithiothreitol-destabilized proteins: Characterization of the formed complexes. *Biochemical and biophysical research communications* **276**, 619-625.
- Alexandre, H., Costello, P., Remize, F., Guzzo, J. & Guilloux-Benatier, M. (2004).** *Saccharomyces cerevisiae* - *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International journal of food microbiology* **93**, 141-154.
- Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Bénatier, M., Remize-Barnavon, F. & Tourdot-Maréchal, R. (2008).** *Les bactéries lactiques en oenologie*: Editions Tec & Doc.
- Almeida, L., Vaz, W., Stuempel, J. & Madeira, V. (1986).** Effect of short-chain primary alcohols on fluidity and activity of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochemistry* **25**, 4832-4839.
- Aredes Fernandez, P., Stivala, M., Rodriguez Vaquero, M. & Farias, M. (2011).** Increase in antioxidant and antihypertensive activity by *Oenococcus oeni* in a yeast autolysis wine model. *Biotechnology letters* **33**, 359-364.
- Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B. & De Maio, A. (2004).** Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *The FASEB journal* **18**, 1636-1645.
- Ashcroft, R., Coster, H. & Smith, J. (1977).** The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The effect of benzyl alcohol on the structure. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **469**, 13-22.

B

- Baker, T. & Sauer, R. (2011).** ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et biophysica acta - Molecular cell research* **1823**, 15-28.
- Balogi, Z., Torok, Z., Balogh, G., Josvay, K., Shigapova, N., Vierling, E., Vigh, L. & Horvalth, I. (2005).** "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Archives of biochemistry and biophysics* **436**, 346-354.
- Balogi, Z., Cheregi, O., Giese, K. C., Juhasz, K., Vierling, E., Vass, I., Vigh, L. & Horvath, I. (2008).** A mutant small heat shock protein with increased thylakoid association provides an elevated resistance against UV-B damage in *Synechocystis* 6803. *Journal of biological chemistry* **283**, 22983-22991.
- Bangham, A., Standish, M. & Watkins, J. (1965).** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology* **13**, 238-252.
- Barbagallo, R., Spagna, G., Palmeri, R. & Torriani, S. (2004).** Assessment of beta-glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and microbial technology* **34**, 292-296.
- Basha, E., Lee, G., Brei, L., Hausrath, A., Buan, N., Giese, K. & Vierling, E. (2004).** The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *Journal of biological chemistry* **279**, 7566-7575.
- Basha, E., Friedrich, K. & Vierling, E. (2006).** The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *Journal of biological chemistry* **281**, 39943-39952.
- Basha, E., O'Neill, H. & Vierling, E. (2011).** Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in biochemical sciences* **37**, 106-117.
- Bilhère, E., Lucas, P., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2009).** Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and environmental microbiology* **75**, 1291-1300.
- Blander, S. & Horwitz, M. (1993).** Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp 60 family of heat shock proteins, induces

- protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 717-723.
- Bligh, E. & Dyer, W. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911-917.
- Bon, E., Delaherche, A., Bilhère, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A. & Le Marrec, C. (2009).** *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *Applied and environmental microbiology* **75**, 2079-2090.
- Borneman, A., Bartowsky, E., McCarthy, J. & Chambers, P. (2010).** Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied microbiology and biotechnology* **86**, 681-691.
- Borneman, A., McCarthy, J., Chambers, P. & Bartowsky, E. (2012).** Functional divergence in the genus *Oenococcus* as predicted by genome sequencing of the newly-described species, *Oenococcus kitaharae*. *PloS one* **7**, 1-10.
- Bova, M., Ding, L., Horwitz, J. & Fung, B. (1997).** Subunit exchange of alphaA-crystallin. *Journal of biological chemistry* **272**, 29511-29517.
- Bova, M., Mchaourab, H., Han, Y. & Fung, B. (2000).** Subunit exchange of small heat shock proteins. *Journal of biological chemistry* **275**, 1035-1042.
- Brady, J., Garland, D., Douglas-Tabor, Y., Robison, W., Groome, A. & Wawrousek, E. (1997).** Targeted disruption of the mouse alphaA-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alphaB-crystallin. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**, 884-889.
- Bridier, J., Claisse, O., Coton, M., Coton, E. & Lonvaud-Funel, A. (2010).** Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. *Applied and environmental microbiology* **76**, 7754-7764.
- Brownell, S., Becker, R. & Steinman, L. (2012).** The protective and therapeutic function of small heat shock proteins in neurological diseases. *Frontiers in Immunology* **3**, 1-10.
- Bruey, J., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A., Solary, E. & Garrido, C. (2000).** Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **19**, 4855-4863.
- Bukach, O., Glukhova, A., Seit-Nebi, A. & Gusev, N. (2009).** Heterooligomeric complexes formed by human small heat shock proteins HspB1 (Hsp27) and HspB6 (Hsp20). *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics* **1794**, 486-495.
- Buttke, T. & Ingram, L. (1980).** Ethanol-induced changes in lipid composition of *Escherichia coli*: Inhibition of saturated fatty acid synthesis *in vitro*. *Archives of biochemistry and biophysics* **203**, 565-571.

C

- Cancino-Diaz, M., Perez-Salazar, J., Dominguez-Lopez, L., Escobar-Gutierrez, A., Granados-Arreola, J., Jimenez-Zamudio, L., Burgos-Vargas, R. & Garcia-Latorre, E. (1998).** Antibody response to Klebsiella pneumoniae 60 kDa protein in familial and sporadic ankylosing spondylitis: role of HLA-B27 and characterization as a GroEL-like protein. *Journal of rheumatology* **25**, 1756-1764.
- Capozzi, V., Weidmann, S., Fiocco, D., Rieu, A., Hols, P., Guzzo, J. & Spano, G. (2011).** Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Research in microbiology* **162**, 419-425.
- Carreté, R., Vidal, M., Bordons, A. & Constanti, M. (2002).** Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS microbiology letters* **211**, 155-159.
- Cavin, J., Prevost, H., Lin, J., Schmitt, P. & Divies, C. (1989).** Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Applied and environmental microbiology* **55**, 751-753.
- Chan, D. & Vogel, H. (2010).** Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical journal* **430**, 1-19.

- Chang, I. S., Kim, B. & Shin, P. (1997).** Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and environmental microbiology* **63**, 1-6.
- Chang, Y. & Cronan, J. (1999).** Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **33**, 249-259.
- Chang, Z., Primm, T., Jakana, J., Lee, I., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. & Quioco, F. (1996).** *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16. 3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *Journal of biological chemistry* **271**, 7218-7223.
- Chen, Y., Lu, Y., Wang, H., Quan, S., Chang, Z. & Sui, S. (2003).** Two-dimensional crystallization of a small heat shock protein HSP16. 3 on lipid layer. *Biochemical and biophysical research communications* **310**, 360-366.
- Chernik, I., Panasenko, O., Li, Y., Marston, S. & Gusev, N. (2004).** pH-induced changes of the structure of small heat shock proteins with molecular mass 24/27 kDa (HspB1). *Biochemical and biophysical research communications* **324**, 1199-1203.
- Chiang, I., Worobo, R., Churey, J. & Henick-Kling, T. (2012).** Growth inhibition of foodborne pathogens by *Oenococcus oeni*. *Journal of Food Science* **77**, 15-19.
- Chowdary, T., Raman, B., Ramakrishna, T. & Rao, C. (2007).** Interaction of mammalian Hsp22 with lipid membranes. *Biochemical journal* **401**, 437.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Maréchal, R., Maréchal, P. & Guzzo, J. (2005).** Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et biophysica acta* **1717**, 118-124.
- Clark, D. & Beard, J. (1979).** Altered phospholipid composition in mutants of *Escherichia coli* sensitive or resistant to organic solvents. *Journal of general microbiology* **113**, 267-274.
- Clark, J. & Muchowski, P. (2000).** Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Current opinion in structural biology* **10**, 52-59.
- Cobb, B. & Petrash, J. (2000).** Characterization of alpha-crystallin-plasma membrane binding. *Journal of biological chemistry* **275**, 6664-6672.
- Conway, J. & Steven, A. (1999).** Methods for reconstructing density maps of 'single' particles from cryoelectron micrographs to subnanometer resolution. *Journal of structural biology* **128**, 106-118.
- Cotter, P. & Hill, C. (2003).** Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews* **67**, 429-453.
- Coucheney, F. (2005).** La protéine Lo18, "small Hsp" de la bactérie *Oenococcus oeni* impliquée dans la fermentation malolactique des vins. Régulation, structure oligomérique et rôle de lipochaperon: Manuscript de thèse.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L. & Guzzo, J. (2005a).** A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International journal of food microbiology* **105**, 463-470.
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P. & 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. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **1720**, 92-98.
- Cronan, J. (2002).** Phospholipid modifications in bacteria. *Current opinion in microbiology* **5**, 202-205.

D

- De Marco, A., Vigh, L., Diamant, S. & Goloubinoff, P. (2005).** Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid-or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell stress & chaperones* **10**, 329-339.
- Delmas, F., Pierre, F., Coucheney, F., Diviès, C. & Guzzo, J. (2001).** Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **3**, 601-610.

- Denich, T., Beaudette, L., Lee, H. & Trevors, J. (2003).** Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of microbiological methods* **52**, 149-182.
- Desroche, N., Beltramo, C. & Guzzo, J. (2005).** Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of microbiological methods* **60**, 325-333.
- Dicks, L., Dellaglio, F. & Collins, M. (1995).** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic bacteriology* **45**, 395-397.
- Diefenbach, R., Heipieper, H. & Keweloh, H. (1992).** The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Applied microbiology and biotechnology* **38**, 382-387.
- Dombek, K. & Ingram, L. (1984).** Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of bacteriology* **157**, 233-239.
- Donato, M., Jurado, A., Antunes-Madeira, M. & Madeira, V. (1997).** *Bacillus stearothermophilus* as a model to evaluate membrane toxicity of a lipophilic environmental pollutant (DDT). *Archives of environmental contamination and toxicology* **33**, 109-116.
- Doyle, S. & Wickner, S. (2009).** Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends in biochemical sciences* **34**, 40-48.
- Dudich, I., Zav'yalov, V., Pfeil, W., Gaestel, M., Zav'yalova, G., Denesyuk, A. & Korpela, T. (1995).** Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. *Biochimica et biophysica acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1253**, 163-168.

E

- Ehrnsperger, M., Hergersberg, C., Wienhues, U., Nichtl, A. & Buchner, J. (1998).** Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25. *Analytical biochemistry* **259**, 218-225.
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. & Buchner, J. (1999).** The dynamics of Hsp25 quaternary structure. *Journal of biological chemistry* **274**, 14867-14874.
- Eifert, C., Burgio, M., Bennett, P., Salerno, J. & Koretz, J. (2005).** N-terminal control of small heat shock protein oligomerization: changes in aggregate size and chaperone-like function. *Biochimica et biophysica acta - Proteins & proteomics* **1748**, 146-156.
- Elsholz, A., Michalik, S., Zuhlke, D., Hecker, M. & Gerth, U. (2010).** CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *The EMBO journal* **29**, 3621-3629.
- Elsholz, A., Hempel, K., Pother, D., Becher, D., Hecker, M. & Gerth, U. (2011).** CtsR inactivation during thiol-specific stress in low GC, Gram+ bacteria. *Molecular microbiology* **79**, 772-785.
- Endo, A. & Okada, S. (2006).** *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 2345-2348.

F

- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. & Pot, B. (2010).** Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International journal of food microbiology* **140**, 136-145.
- Fortier, L., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., Lee, B. & Guzzo, J. (2003).** Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS microbiology letters* **222**, 165-169.
- Foster, D. & Fillingame, R. (1982).** Stoichiometry of subunits in the H⁺-ATPase complex of *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry* **257**, 2009-2015.

- Franzetti, B., Schoehn, G., Hernandez, J., Jaquinod, M., Ruigrok, R. & Zaccai, G. (2002).** Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea. *The EMBO journal* **21**, 2132-2138.
- Friedlander, G., Le Grimellec, C., Giocondi, M. & Amiel, C. (1987).** Benzyl alcohol increases membrane fluidity and modulates cyclic AMP synthesis in intact renal epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **903**, 341-348.
- Fu, X. & Chang, Z. (2004).** Temperature-dependent subunit exchange and chaperone-like activities of Hsp16. 3, a small heat shock protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical and biophysical research communications* **316**, 291-299.
- Fujita, Y., Matsuoka, H. & Hirooka, K. (2007).** Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular microbiology* **66**, 829-839.

G

- Galland, D., Tourdot-Maréchal, R., Abraham, M., Chu, K. & Guzzo, J. (2003).** Absence of malolactic activity is a characteristic of H⁺-ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and environmental microbiology* **69**, 1973-1979.
- Garrido, C., Paul, C., Seigneuric, R. & Kampinga, H. (2012).** The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 1588-1592.
- Garvie, E. (1967).** *Leuconostoc oenos* sp. nov. *Journal of general microbiology* **48**, 431.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C. & Kelley, W. (2007).** The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Molecular microbiology* **66**, 840-857.
- Giese, K. & Vierling, E. (2002).** Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *Journal of biological chemistry* **277**, 46310-46318.
- Giese, K., Basha, E., Catague, B. & Vierling, E. (2005).** Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of in vitro chaperone activity. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **102**, 18896-18901.
- Gillis, T., Miller, R., Young, D., Khanolkar, S. & Buchanan, T. (1985).** Immunochemical characterization of a protein associated with *Mycobacterium leprae* cell wall. *Infection and immunity* **49**, 371-377.
- Glatz, A., Vass, I., Los, D. & Vigh, L. (1999).** The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes. *Plant physiology and biochemistry* **37**, 1-12.
- Gobbo, J., Gaucher-Di-Stasio, C., Weidmann, S., Guzzo, J. & Garrido, C. (2011).** Quantification of HSP27 and HSP70 molecular chaperone activities. *Methods in molecular biology* **787**, 137-143.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (1999).** Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proceedings of the national academy of sciences* **96**, 13732-13737.
- Gordon, L., Sauerheber, R., Esgate, J., Dipple, I., Marchmont, R. & Houslay, M. (1980).** The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *Journal of biological chemistry* **255**, 4519-4527.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C. & Guzzo, J. (2005).** CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of bacteriology* **187**, 5614-5623.
- Grandvalet, C., Assad-Garcia, J., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J. & Tourdot-Maréchal, R. (2008).** Changes in membrane lipid composition in ethanol-and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the cfa gene by heterologous complementation. *Microbiology* **154**, 2611-2619.
- Grogan, D. & Cronan Jr, J. (1997).** Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* **61**, 429-441.

- Guilloux-Benatier, M., Feuillat, M. & Ciolfi, B. (1985).** Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries isolées du vin: effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis* **24**, 59-74.
- Gustafson, C. & Tagesson, C. (1985).** Influence of organic solvent mixtures on biological membranes. *British journal of industrial medicine* **42**, 591-595.
- Guzzo, J., Cavin, J. & Diviès, C. (1994).** Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology letters* **16**, 1189-1194.
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J. & Diviès, C. (1997).** A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in applied microbiology* **24**, 393-396.
- Guzzo, J., Jobin, M. & Diviès, C. (1998).** Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS microbiology letters* **160**, 43-47.
- Guzzo, J., Jobin, M., Delmas, F., Fortier, L., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B. & Diviès, C. (2000).** Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International journal of food microbiology* **55**, 27-31.
- Guzzo, J., Desroche, N., Quatravaux, S. & Arbault, P. (2010).** Method for modifying the coagulation and syneresis of milk: EP Patent 2,191,729.
- Guzzo, J. (2012).** Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *The International journal of biochemistry & cell biology* **44**, 1698-1705.

H

- Haley, D., Horwitz, J. & Stewart, P. (1998).** The small heat-shock protein, alpha B-crystallin, has a variable quaternary structure. *Journal of molecular biology* **277**, 27-35.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Bisch, M., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D. & Ennahar, S. (2012).** Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics. *Journal of proteome research* **11**, 109-118.
- Han, M., Park, S., Park, T. & Lee, S. (2004).** Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering* **88**, 426-436.
- Han, M., Yun, H. & Lee, S. (2008).** Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnology advances* **26**, 591-609.
- Harrison, C. (2003).** GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell stress & chaperones* **8**, 218-223.
- Hartl, F. & Hayer-Hartl, M. (2009).** Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural & molecular biology* **16**, 574-581.
- Hartl, F., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011).** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332.
- Hasegawa, Y., Kawada, N. & Nosoh, Y. (1980).** Change in chemical composition of membrane of *Bacillus caldotenax* after shifting the growth temperature. *Archives of microbiology* **126**, 103-108.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H., Chen, S., Saibil, H. & Buchner, J. (1999).** Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO journal* **18**, 6744-6751.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D. & Buchner, J. (2005).** Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**, 842-846.
- Haslbeck, M., Kastenmuller, A., Buchner, J., Weinkauff, S. & Braun, N. (2008).** Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *Journal of molecular biology* **378**, 362-374.
- Hazel, J. & Williams, E. (1990).** The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research* **29**, 167-227.
- Hendrick, J. & Hartl, F. (1993).** Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review of biochemistry* **62**, 349-384.
- Hilario, E., Teixeira, E., Pedroso, G., Bertolini, M. & Medrano, F. (2006).** Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of XAC1151, a small heat-shock protein from

- Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* belonging to the alpha-crystallin family. *Acta Crystallographica Section F: Structural biology and crystallization communications* **62**, 446-448.
- Hilario, E., Martin, F., Bertolini, M. & Fan, L. (2011).** Crystal structures of *Xanthomonas* small heat shock protein provide a structural basis for an active molecular chaperone oligomer. *Journal of molecular biology* **408**, 74-86.
- Hornby, A. & Cullis, P. (1981).** Influence of local and neutral anaesthetics on the polymorphic phase preferences of egg yolk phosphatidylethanolamine. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **647**, 285-292.
- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V. & other authors (1998).** Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proceedings of the national academy of sciences* **95**, 3513-3518.
- Horvath, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A. & Vigh, L. (2008).** Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **1778**, 1653-1664.
- Horvath, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M., Munnik, T., Saidi, Y., Goloubinoff, P., Harwood, J. & Vigh, L. (2012).** Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections. *Progress in lipid research* **51**, 208-220.
- Horwitz, J. (1992).** Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the national academy of sciences* **89**, 10449-10453.
- Horwitz, J., Bova, M., Ding, L., Haley, D. & Stewart, P. (1999).** Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye* **13**, 403-408.
- Houry, W. (2001).** Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Current protein and peptide science* **2**, 227-244.
- Hutkins, R. & Nannen, N. (1993).** pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of dairy science* **76**, 2354-2365.

I

- Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Nohara, D. & Kato, K. (2001).** Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *Journal of biological chemistry* **276**, 5346-5352.

J

- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. (1993).** Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of biological chemistry* **268**, 1517-1520.
- Jaya, N., Garcia, V. & Vierling, E. (2009).** Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proceedings of the national academy of sciences* **106**, 15604-15609.
- Jehle, S., Rajagopal, P., Bardiaux, B. & other authors (2010).** Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of alpha B-crystallin oligomers. *Nature structural & molecular biology* **17**, 1037-1042.
- Jiao, W., Qian, M., Li, P., Zhao, L. & Chang, Z. (2005).** The essential role of the flexible termini in the temperature-responsiveness of the oligomeric state and chaperone-like activity for the polydisperse small heat shock protein IbpB from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **347**, 871-884.
- Jobin, M., Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C. & Guzzo, J. (1997).** Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Applied and environmental microbiology* **63**, 609-614.
- Johnson, S., Bangham, A., Hill, M. & Korn, E. (1971).** Single bilayer liposomes. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **223**, 820-826.

K

- Kajfasz, J., Martinez, A., Rivera-Ramos, I., Abranches, J., Koo, H., Quivey Jr, R. & Lemos, J. (2009). Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* **191**, 2060-2068.
- Kato, K., Hasegawa, K., Goto, S. & Inaguma, Y. (1994). Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *Journal of biological chemistry* **269**, 11274-11278.
- Kennaway, C., Benesch, J., Gohlke, U., Wang, L., Robinson, C., Orlova, E., Saibi, H. & Keep, N. (2005). Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of biological chemistry* **280**, 33419-33425.
- Kim, K., Kim, R. & Kim, S. (1998a). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**, 595-599.
- Kim, R., Kim, K., Yokota, H. & Kim, S. (1998b). Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proceedings of the national academy of sciences* **95**, 9129-9133.
- Kirkegaard, T., Roth, A., Petersen, N. & other authors (2010). Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* **463**, 549-553.
- Kirstein, J., Zuhlke, D., Gerth, U., Turgay, K. & Hecker, M. (2005). A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *The EMBO journal* **24**, 3435-3445.
- Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A., Bukau, B. & Turgay, K. (2006). Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *The EMBO journal* **25**, 1481-1491.
- Kirstein, J., Dougan, D., Gerth, U., Hecker, M. & Turgay, K. (2007). The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *The EMBO journal* **26**, 2061-2070.
- Kirstein, J., Hoffmann, A., Lilie, H., Schmidt, R., Rubsamen-Waigmann, H., Brotz-Oesterhelt, H., Mogk, A. & Turgay, K. (2009). The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Molecular Medicine* **1**, 37-49.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F. & other authors (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van leeuwenhoek* **82**, 29-58.
- Klemenz, R., Fröhli, E., Steiger, R., Schäfer, R. & Aoyama, A. (1997). Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proceedings of the national academy of sciences USA* **88**, 3652-3656.
- Knoll, C., Divol, B. & du Toit, M. (2008). Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food microbiology* **25**, 983-991.
- Koteiche, H. & Mchaourab, H. (1999). Folding pattern of the alpha-crystallin domain in alpha A-crystallin determined by site-directed spin labeling. *Journal of molecular biology* **294**, 561-577.
- Koteiche, H., Chiu, S., Majdoch, R., Stewart, P. & Mchaourab, H. (2005). Atomic models by cryo-EM and site-directed spin labeling: application to the N-terminal region of Hsp16. 5. *Structure* **13**, 1165-1171.
- Kovacs, E., van der Vies, S., Glatz, A., Torok, Z., Varvasovszki, V., Horvath, I. & Vigh, L. (2001). The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochemical and biophysical research communications* **289**, 908-915.
- Kress, W., Maglica, Z. & Weber-Ban, E. (2009). Clp chaperone-proteases: structure and function. *Research in microbiology* **160**, 618-628.
- Krishnasamy, S., Mannan, R., Krishnan, M. & Gnanam, A. (1988). Heat shock response of the chloroplast genome in *Vigna sinensis*. *Journal of biological chemistry* **263**, 5104-5109.

L

- Laganowsky, A., Benesch, J., Landau, M. & other authors (2010). Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein science* **19**, 1031-1043.

- Laksanalamai, P., Jiemjit, A., Bu, Z., Maeder, D. & Robb, F. (2003).** Multi-subunit assembly of the *Pyrococcus furiosus* small heat shock protein is essential for cellular protection at high temperature. *Extremophiles* **7**, 79-83.
- Laksanalamai, P. & Robb, F. (2004).** Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles* **8**, 1-11.
- Laskowska, E., Matuszewska, E. & Kuczynska-Wisnik, D. (2010).** Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases. *Current pharmaceutical biotechnology* **11**, 146-157.
- Lee, S., Owen, H., Prochaska, D. & Barnum, S. (2000).** HSP16. 6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current microbiology* **40**, 283-287.
- Lee, S., Sowa, M., Watanabe, Y., Sigler, P., Chiu, W., Yoshida, M. & Tsai, F. (2003).** The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**, 229-240.
- Lee, S., Sowa, M., Choi, J. & Tsai, F. (2004).** The ClpB/Hsp104 molecular chaperone - a protein disaggregating machine. *Journal of structural biology* **146**, 99-105.
- Lee, S. & Tsai, F. (2005).** Molecular chaperones in protein quality control. *Journal of biochemistry and molecular biology* **38**, 259-265.
- Lentze, N., Studer, S. & Narberhaus, F. (2003).** Structural and functional defects caused by point mutations in the alpha-crystallin domain of a bacterial alpha-heat shock protein. *Journal of molecular biology* **328**, 927-937.
- Lentze, N., Aquilina, J., Lindbauer, M., Robinson, C. & Narberhaus, F. (2004).** Temperature and concentration-controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *European journal of biochemistry* **271**, 2494-2503.
- Lepage, C., Fayolle, F., Hermann, M. & Vandecasteele, J. (1987).** Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. *Journal of general microbiology* **133**, 103-110.
- Leroux, M., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G. & Candido, E. (1997).** Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *Journal of biological chemistry* **272**, 24646-24656.
- LeThanh, H., Neubauer, P. & Hoffmann, F. (2005).** The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microbial cell factories* **4**, 1-12.
- Li, C., Wang, L., Ning, X., Chen, A., Zhang, L., Qin, S., Wu, H. & Zhao, J. (2010).** Identification of two small heat shock proteins with different response profile to cadmium and pathogen stresses in *Venerupis philippinarum*. *Cell stress and chaperones* **15**, 897-904.
- Liu, S. & Pilone, G. (1998).** A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of applied microbiology* **84**, 315-327.
- 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 microbiology letters* **199**, 9-13.
- Lu, Y. & Rock, C. (2006).** Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* **59**, 551-566.

M

- Mackay, D., Andley, U. & Shiels, A. (2003).** Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q. *European journal of human genetics* **11**, 784-793.
- Madigan, M. & Martinko, J. (2007).** Brock, Biologie des micro-organismes.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. & Cronan Jr, J. (1993).** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **57**, 522-542.
- Maitre, M., Weidmann, S., Rieu, A., Fenel, D., Schoehn, G., Ebel, C., Coves, J. & Guzzo, J. (2012).** The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni*

- influences its role in both membrane stabilization and protein protection. *Biochemical journal* **444**, 97-104.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y. & other authors (2006).** Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences* **103**, 15611-15616.
- Mandersloot, J., Gerritsen, W., Leunissen-Bijvelt, J., Van Echteld, C., Noordam, P. & De Gier, J. (1981).** Ca²⁺-induced changes in the barrier properties of cardiolipin/phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **640**, 106-113.
- Mansilla, M. & de Mendoza, D. (2005).** The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Archives of microbiology* **183**, 229-235.
- Mao, Q., Ke, D. & Chang, Z. (2001).** Electrostatic interactions play a critical role in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16. 3 binding of substrate proteins. *Biochemistry* **66**, 904-908.
- Marcobal, A., Sela, D., Wolf, Y., Makarova, K. & Mills, D. (2008).** Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *Journal of bacteriology* **190**, 564-570.
- Marrakchi, H., Choi, K. & Rock, C. (2002).** A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of biological chemistry* **277**, 44809-44816.
- McDonald, E., Bortolus, M., Koteiche, H. & Mchaourab, H. (2012).** Sequence, structure and dynamic determinants of Hsp27 (HspB1) equilibrium dissociation are encoded by the N-terminal domain. *Biochemistry* **51**, 1257-1268.
- Méchin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. & Leveau, J. (1999).** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *Journal of applied microbiology* **86**, 859-866.
- Meng, F. & Xu, Y. (2010).** Purification and characterization of an anti-Prelog alcohol dehydrogenase from *Oenococcus oeni* that reduces 2-octanone to (R)-2-octanol. *Biotechnology letters* **32**, 533-537.
- Miethke, M., Hecker, M. & Gerth, U. (2006).** Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control. *Journal of bacteriology* **188**, 4610-4619.
- Mills, D., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D. & Makarova, K. (2005).** Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS microbiology reviews* **29**, 465-475.
- Molière, N. & Turgay, K. (2009).** Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Research in microbiology* **160**, 637-644.
- Morein, S., Andersson, A., Rilfors, L. & Lindblom, G. (1996).** Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structures. *Journal of biological chemistry* **271**, 6801-6809.
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M., Denizot, F. & Rapoport, G. (1998).** ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Molecular microbiology* **27**, 899-914.
- N**
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V. & Berche, P. (1999).** ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology* **31**, 185-196.
- Nakamoto, H. & Vigh, L. (2007).** The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and molecular life sciences* **64**, 294-306.
- Narberhaus, F. (2002).** Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and molecular biology reviews* **66**, 64-93.
- Newman, G. & Crooke, E. (2000).** DnaA, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, is located at the cell membrane. *Journal of bacteriology* **182**, 2604-2610.
- Nitta, K., Suzuki, N., Honma, D., Kaneko, Y. & Nakamoto, H. (2005).** Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria. *FEBS letters* **579**, 1235-1242.
- Niu, H., Hu, L., Li, Q. & other authors (2011).** Construction and evaluation of a multistage *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccine candidate Mtb10. 4-HspX. *Vaccine* **29**, 9451-9458.

P

- Perera, I. & Grove, A. (2010).** Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *Journal of molecular cell biology* **2**, 243-254.
- Perng, M., Cairns, L., van den IJssel, P., Prescott, A., Hutcheson, A. & Quinlan, R. (1999a).** Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *Journal of cell science* **112**, 2099-2112.
- Perng, M., Muchowski, P., van den IJssel, P., Wu, G., Hutcheson, A., Clark, J. & Quinlan, R. (1999b).** The cardiomyopathy and lens cataract mutation in alpha B-crystallin alters its protein structure, chaperone activity, and interaction with intermediate filaments *in vitro*. *Journal of biological chemistry* **274**, 33235-33243.
- Phadtare, S. (2004).** Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current issues in molecular biology* **6**, 125-136.
- Porta, A., Torok, Z., Horvath, I., Franceschelli, S., Vigh, L. & Maresca, B. (2010).** Genetic modification of the *Salmonella* membrane physical state alters the pattern of heat shock response. *Journal of bacteriology* **192**, 1988-1998.
- Poulain, P., Gelly, J. & Flatters, D. (2010).** Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PloS one* **5**, 1-10.
- Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (2010).** *Microbiology*, 3ème édition edn: De Boeck.

R

- Reddy, G., Kumar, P. & Kumar, M. (2006).** Chaperone alpha-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin. *Iubmb life* **58**, 632-641.
- Reischl, S., Thake, S., Homuth, G. & Schumann, W. (2001).** Transcriptional analysis of three *Bacillus subtilis* genes coding for proteins with the alpha-crystallin domain characteristic of small heat shock proteins. *FEMS microbiology letters* **194**, 99-103.
- Ritossa, F. (1962).** A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.
- Rock, C. & Cronan, J. (1996).** *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* **1302**, 1-16.
- Ronez, F. (2012).** Exploration fonctionnelle et valorisation industrielle de la protéine de choc thermique bactérienne Lo18: Manuscrit de thèse.

S

- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J., Dias, M. & Konings, W. (1994).** Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *European journal of biochemistry* **225**, 289-295.
- Salema, M., Lolkema, J., San Romao, M. & Dias, M. (1996).** The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of bacteriology* **178**, 3127-3132.
- Scopio, A., Johnson, P., Laquerre, A. & Nelson, D. (1994).** Subcellular localization and chaperone activities of *Borrelia burgdorferi* Hsp60 and Hsp70. *Journal of bacteriology* **176**, 6449-6456.
- Servant, P. & Mazodier, P. (1995).** Characterization of *Streptomyces albus* 18-kilodalton heat shock-responsive protein. *Journal of bacteriology* **177**, 2998-3003.
- Sharma, K., Kaur, H., Kumar, G. & Kester, K. (1998a).** Interaction of 1,1'-bi (4-anilino) naphthalene-5,5'-disulfonic acid with alpha-crystallin. *Journal of biological chemistry* **273**, 8965-8970.
- Sharma, K., Kumar, G., Murphy, A. & Kester, K. (1998b).** Identification of 1,1'-bi (4-anilino) naphthalene-5, 5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *Journal of biological chemistry* **273**, 15474-15478.

- Sharma, S., De Los Rios, P., Christen, P., Lustig, A. & Goloubinoff, P. (2010). The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nature chemical biology* **6**, 914-920.
- Shimojima, M., Tsuchiya, M. & Ohta, H. (2009). Temperature-dependent hyper-activation of monoglucosyldiacylglycerol synthase is post-translationally regulated in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS letters* **583**, 2372-2376.
- Shinitzky, M. (1984). Membrane fluidity and cellular functions. *Physiology of membrane fluidity* **1**, 1-51.
- Shivaji, S. & Prakash, J. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of microbiology* **192**, 85-95.
- Siddique, M., Port, M., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., Calligaris, R., Winkelhaus, S. & Scharf, K. D. (2003). Tomato heat stress protein Hsp16. 1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell stress & chaperones* **8**, 381-394.
- Sikkema, J., De Bont, J. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews* **59**, 201-222.
- Singer, S. & Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Singleton, P. (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, 6ème édition edn: Dunod.
- Skjaerven, L., Reuter, N. & Martinez, A. (2011). Dynamics, flexibility and ligand-induced conformational changes in biological macromolecules: a computational approach. *Future* **3**, 2079-2100.
- Stamler, R., Kappe, G., Boelens, W. & Slingsby, C. (2005). Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *Journal of molecular biology* **353**, 68-79.
- Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J. (2003). Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *Journal of biological chemistry* **278**, 18015-18021.
- Studer, S., Obrist, M., Lentze, N. & Narberhaus, F. (2002). A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *European journal of biochemistry* **269**, 3578-3586.
- Sugimoto, S. & Sonomoto, K. (2008). Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. *Journal of bioscience and bioengineering* **106**, 324-336.
- Sun, Y. & MacRae, T. (2005a). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and molecular life sciences* **62**, 2460-2476.
- Sun, Y. & MacRae, T. (2005b). The small heat shock proteins and their role in human disease. *Febs journal* **272**, 2613-2627.
- Suzuki, I., Los, D., Kanesaki, Y., Mikami, K. & Murata, N. (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *Science signalling* **19**, 1327-1334.

T

- Tao, L., Chatteraj, P. & Biswas, I. (2012). CtsR regulation in *mcsAB*-deficient Gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **194**, 1361-1368.
- Teixeira, H., Goncalves, M., Rozes, N., Ramos, A. & San Romao, M. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microbial ecology* **43**, 146-153.
- Tissier, A., Mitchell, H. & Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular microbiology* **84**, 389-398.
- To, T., Grandvalet, C. & Tourdot-Maréchal, R. (2011). Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and environmental microbiology* **77**, 3327-3334.
- Torok, Z., Horvath, I., Goloubinoff, P., Kovacs, E., Glatz, A., Balogh, G. & Vigh, L. (1997). Evidence for a lipochaperonin: association of active protein folding GroESL oligomers with

- lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**, 2192-2197.
- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I. & other authors (2001).** *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the national academy of sciences* **98**, 3098-3103.
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L., Guzzo, J., Lee, B. & Diviès, C. (1999).** Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS microbiology letters* **178**, 319-326.
- Tran, T., Kwon, H., Kim, E., Kim, K., Briles, D., Pyo, S. & Rhee, D. (2011).** Heat-Shock protein ClpL/HSP100 increases penicillin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Advances in oto-rhino-laryngology* **72**, 126-128.
- Trevors, J. (2003).** Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of biochemical and biophysical methods* **57**, 87-103.
- Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. & Triantafilou, K. (2002).** Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science* **115**, 2603-2611.
- Tsvetkova, N., Horvath, I., Torok, Z. & other authors (2002).** Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the national academy of sciences* **99**, 13504-13509.

U

- Uchida, K. (1975).** Alteration of the unsaturated to saturated ratio of fatty acids in bacterial lipids by alcohols. *Agricultural and biological chemistry* **39**, 1515-1516.

V

- Vabulas, R., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. (2010).** Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold spring harbor perspectives in biology* **2**, 1-18.
- van Montfort, R., Basha, E., Friedrich, K., Slingsby, C. & Vierling, E. (2001).** Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature structural & molecular biology* **8**, 1025-1030.
- Varmanen, P., Vogensen, F., Hammer, K., Palva, A. & Ingmer, H. (2003).** ClpE from *Lactococcus lactis* promotes repression of CtsR-dependent gene expression. *Journal of bacteriology* **185**, 5117-5124.
- Varvasovszki, V., Glatz, A., Shigapova, N., Josvay, K. & Horvath, I. (2003).** Only one *dnaK* homolog, *dnaK2*, is active transcriptionally and is essential in *Synechocystis*. *Biochemical and biophysical research communications* **305**, 641-648.
- Vigh, L., Los, D., Horvath, I. & Murata, N. (1993).** The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of the national academy of sciences* **90**, 9090-9094.
- Vigh, L., Escriba, P., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Piotto, S., Maresca, B., Horvath, I. & Harwood, J. (2005).** The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Progress in lipid research* **44**, 303-344.
- Vigh, L., Horvath, I., Maresca, B. & Harwood, J. (2007a).** Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'? *Trends in biochemical sciences* **32**, 357-363.
- Vigh, L., Torok, Z., Balogh, G., Glatz, A., Piotto, S. & Horvath, I. (2007b).** *Molecular aspects of the stress response: Chaperones, membranes and networks - Membrane-regulated stress response*: Springer.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. & Glories, Y. (1997).** Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food microbiology* **14**, 291-300.

Voet, D. & Voet, J. (2005). *Biochimie*, 2ème édition edn: De Boeck Supérieur.

W

Weber, F. & De Bont, J. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1286**, 225-245.

Weidmann, S., Rieu, A., Rega, M., Coucheney, F. & 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 microbiology letters* **309**, 8-15.

White, H., Orlova, E., Chen, S. & other authors (2006). Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* **14**, 1197-1204.

X

Xu, Z., Horwich, A. & Sigler, P. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) 7 chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750.

Y

Yeh, C., Chang, P., Yeh, K., Lin, W., Chen, Y. & Lin, C. (1997). Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16. 9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proceedings of the national academy of sciences* **94**, 10967-10972.

Yu, A. & Houry, W. (2007). ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS letters* **581**, 3749-3757.

Yuan, Y., Crane, D. & Barry, C. (1996). Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *Journal of bacteriology* **178**, 4484-4492.

Yuan, Y., Crane, D., Simpson, R., Zhu, Y., Hickey, M., Sherman, D. & Barry, C. (1998). The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proceedings of the national Academy of sciences* **95**, 9578-9583.

Z

Zhang, H., Fu, X., Jiao, W., Zhang, X., Liu, C. & Chang, Z. (2005). The association of small heat shock protein Hsp16. 3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: Dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochemical and biophysical research communications* **330**, 1055-1061.

Zhang, Q., Xu, S., Wang, H., Xu, W., Zhang, X., Wu, K., Liu, L. & Yin, Y. (2009). Contribution of ClpE to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Canadian journal of microbiology* **55**, 1187-1194.

Zhang, Y. & Rock, C. (2009). Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *Journal of lipid research* **50**, 115-119.

Zhang, Z., Zeng, J., Yin, H., Tang, D., Borchman, D. & Paterson, C. (1999). Membrane lipid alpha-crystallin interaction and membrane Ca²⁺-ATPase activities. *Current eye research* **18**, 56-61.

Zolkiewski, M., Zhang, T. & Nagy, M. (2012). Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones. *Archives of biochemistry and biophysics* **520**, 1-6.