



Etude des mécanismes moléculaires de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et mise en oeuvre d'outils pour l'exploration fonctionnelle de gènes d'intérêt oenologique

Maud Darsonval

► **To cite this version:**

Maud Darsonval. Etude des mécanismes moléculaires de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et mise en oeuvre d'outils pour l'exploration fonctionnelle de gènes d'intérêt oenologique. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS065 . tel-01660508

HAL Id: tel-01660508

<https://theses.hal.science/tel-01660508>

Submitted on 11 Dec 2017

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

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



UNIVERSITE BOURGOGNE-FRANCHE COMTE, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
UMR PAM, Equipe VALMiS
Ecole doctorale ES-Environnements-Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialités : **Microbiologie - Biologie Moléculaire**
Discipline : Sciences de l'Alimentation

Présentée par

Maud DARSONVAL

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

Le 9 Décembre 2015

Etude des mécanismes moléculaires de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et mise en œuvre d'outils pour l'exploration fonctionnelle de gènes d'intérêt œnologique

Membres du jury :

Pascale SERROR	DR, INRA, Jouy en Josas	Examineur
Nathalie LEBLOND-BOURGET	Pr, Université de Lorraine, Nancy	Rapporteur
Claire LE HENAFF	Pr, INP ENSCBP, Bordeaux	Rapporteur
Dominique GARMYN	MCF, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Cosette GRANDVALET	MCF, Agrosup, Dijon	Directrice de thèse
Tarek MSADEK	DR, Institut Pasteur	Co-directeur de thèse

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de la Vigne et du Vin Jules Guyot à Dijon, au sein de l'équipe VALMiS (Vin Aliment Microbiologie et Stress) de l'UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques). Elle a été financée par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

Dès les premières lignes de ce manuscrit, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour leur contribution : Pascale Serror pour avoir endossé le rôle de présidente du jury, Claire Le Henaff et Nathalie Leblond-Bourget pour avoir accepté la charge de rapporteur ainsi que Dominique Garmyn qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Ce travail n'aurait pas pu exister et aboutir sans ma directrice de thèse, Cosette Grandvalet, que je tiens particulièrement à remercier pour m'avoir accordée sa confiance et son soutien inconditionnel. Merci pour ton implication et ton engagement dans mon travail de recherche. Ton aptitude à toujours voir le meilleur dans toutes les situations est un vrai plus lorsque *Oenococcus oeni* fait des siennes ! J'aimerais également te dire à quel point j'ai apprécié ta grande disponibilité et ton respect des délais de relecture de ce manuscrit et des articles. Durant ces trois années, j'ai eu le plaisir d'avoir une chef qui m'a suivi, épaulé et servi de psychologue dans les moments de déprim'.

Je remercie également Tarek Msadek, mon co-directeur de thèse, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux tout en y gardant un œil critique.

Je remercie particulièrement Dominique Garmyn pour ses conseils, ses discussions scientifiques et ses services de bibliothécaire (toujours gracieux).

Je remercie Aurélie Rieu, Stéphanie Weidmann et Julie Laurent de m'avoir confié les enseignements de microbiologie des L2 et de m'avoir accompagné tout au long de cette expérience.

Un grand merci aux doctorants avec qui j'ai partagé les hauts et les bas (surtout) de la recherche et de la vie au labo et qui sont devenus des amis : Magali, Momo, Charlie, Chloé, Hélène, les Cédrics, Alex, Bao, Nabil, Jana, Clément et Arnaud.

Je remercie Magali qui avec patience m'a transmis son expertise dans le domptage de *O. oeni* ! Merci pour tes conseils et ta patience face aux milliers de questions que je t'ai adressées et que je continue à te poser !

Un merci particulier à Chloé, Alex et Magali pour les pauses déjeuners uniques. Et même s'il a fallu négocier auprès d'Alex pour qu'il partage son dessert, merci à Audrey qui a quand même réussi à me glisser des tiramisus excellents pour le moral.

Une pensée particulière pour Chloé pour nos sorties piscine, les cours de tricot, nos papotages, nos soirées bières, et notre séjour en Afrique du Sud On a survécu à la course dans l'aéroport de Johannesburg (heureusement que ta valise est rose !), à la conduite à gauche avec la « tondeuse » et le GPS récalcitrant et à tes tentatives de communications avec les manchots et les dammanes (parce que ça ressemble à des jolies marmottes) !

Une pensée particulière pour Vanessa et Laurence toujours de bonne humeur et disponibles pour des conseils scientifiques comme pour nos papotages et nos sorties piscines ...

L'aboutissement de cette aventure n'aurait pas pu être possible sans le soutien de ma famille :

Mes parents qui m'ont toujours fait confiance et encouragé dans mes choix tout au long de mes études. Qu'ils trouvent dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leur soutien ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Merci à Aurélie, Guillaume et Arthur qui sont toujours là pour les moments de détente !

Et surtout merci à Adrien pour son inconditionnel soutien lors des (nombreux) moments de doute, son écoute et sa patience quotidienne !

Et enfin merci à mon amie *Oenococcus oeni* pour m'avoir pourri la vie jour et nuit pendant trois ans ! Tu vas me manquer (ou pas).

Merci à tous !!

Liste des abréviations

aa : acide aminé
AAA : ATPases Associated with a variety of cellular Activities
ADP : Adénosine Di-Phosphate
ARNas : Acide Ribo Nucléique antisens
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BA : Benzyl Alcool
pb : paires de bases
CFA : Cyclic Fatty Acids
Clp : Caseine lipolytic protein
CtsR : Class three stress Regulator
CR : Cercle Roulant
EM : Enzyme Malique
EML : Enzyme MaloLactique
FA : Fermentation Alcoolique
FML : Fermentation MaloLactique
GC/MS : Gaz Chromatography coupled to Mass Spectrometry (chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse)
GRAS : « Generally Recognised As Safe »
Hsp : Heat shock protein
sHsp : small Heat Shock Protein
HTH : « Helix-Turn-Helix » (Hélice-Boucle-Hélice)
kpb : kilo paires de bases
MLST : MultiLocus Sequence Typing
NBD : Nucleotide Binding Domain
ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Two Dimensions PolyAcrylamide GEl
PFGE : Pulse-Field Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel d'agarose en champ pulsé)
pHint : pH intracellulaire
QPS : « Qualified Presumption of Safety »
SBD : Substrat Binding Domain
SH : Subtractive Hybridization
SPME : Solid Phase MicroExtraction (MicroExtraction sur Phase Solide)

Liste des travaux

Articles

M. Darsonval, T. Msadek, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **2015**. The antisense RNA approach: a new application for *in vivo* stress response investigation in *Oenococcus oeni*. *Applied Environmental Microbiology*.

M. Darsonval, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **2015**. Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of *estA2* and *estA7* esterase genes on wine ester profile. (soumis à *Food Microbiology*).

M. Darsonval, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **2015**. Impact of *Oenococcus oeni* esterase EstA7 on wine aromatic compounds. *Actes OENO2015* (in press).

Communications orales

M. Darsonval, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **Juillet 2015**. “Impact of *Oenococcus oeni* esterase EstA7 on wine aromatic compounds”. *10^{ème} Symposium international d’œnologie de Bordeaux*, Bordeaux, France.

M. Darsonval, Cosette Grandvalet, T. Msadek and H. Alexandre. **Juin 2015**. “Use of antisense RNA to modulate *hsp* gene expression in *Oenococcus oeni*.” *XVI^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs*, Besançon, France.

M. Darsonval, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **Septembre 2014**. “Impact of Lactic Acid Bacteria Esterase Activity on Wine Aromatic Compounds”. *MACROWINE 2014*. Stellenbosch, Afrique du Sud.

Communications affichées

M. Darsonval, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **Juillet 2015**. “Impact of *Oenococcus oeni* esterase EstA7 on wine aromatic compounds”. *OENO2015, 10^{ème} Symposium international d’œnologie de Bordeaux*. Bordeaux, France.

M. Darsonval, T. Msadek, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **Juin 2015**. “Characterization of CtsR, the master regulator of stress response *Oenococcus oeni*”. *8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms*, Montecatini Terme, Italie.

M. Darsonval, T. Msadek, H. Alexandre and Cosette Grandvalet. **Mai 2015**. “Use of antisense RNA to modulate *hsp* gene expression in *Oenococcus oeni*”. 6th congress of European microbiologists, FEMS 2015, Maastricht, Pays-Bas.

M. Darsonval, Cosette Grandvalet, T. Msadek and H. Alexandre. **Juin 2014**. “Characterization of the regulation of the CtsR Activity in *Oenococcus oeni* by using heterologous expression system”. XV^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon, France. **(Prix du meilleur poster)**.

M. Darsonval, Cosette Grandvalet, T. Msadek and H. Alexandre. **Juin 2013**. « Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l’activité de CtsR : Unique régulateur de la réponse au stress caractérisé chez *Oenococcus oeni*. XIV^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France.

Sommaire

Avant-propos	1
Synthèse bibliographique	7
I. <i>Oenococcus oeni</i> et le milieu vin.....	9
I.1. <i>O. oeni</i> : une bactérie lactique.....	9
I.1.1. Propriétés des bactéries lactiques.....	9
I.1.2. L'espèce <i>O. oeni</i>	10
I.2. <i>O. oeni</i> : un ferment malolactique.....	15
I.2.1. La fermentation malolactique.....	15
I.2.2. Impacts positifs de la FML sur les propriétés organoleptiques du vin.....	19
I.2.2.1. Diminution de l'acidité totale et stabilité microbienne	20
I.2.2.2. Modification de la couleur et de la saveur du vin	20
I.2.2.3. Impact de la FML sur le profil aromatique du vin	21
I.2.3. Impacts négatifs de la FML.....	28
I.3. Mécanismes d'adaptation de <i>O. oeni</i> aux conditions vins	29
I.3.1. Contraintes techniques et physicochimiques.....	29
I.3.1.1. Qu'est-ce qu'un stress ?	29
I.3.1.2. Contraintes physico-chimiques et techniques du milieu vin.....	30
I.3.2. Mécanismes d'adaptation de <i>O. oeni</i> dans le milieu vin.....	33
I.3.2.1. La régulation de pH intracellulaire.....	33
I.3.2.2. Maintien de l'intégrité membranaire.....	34
I.3.2.3. Réponse générale aux stress de <i>O. oeni</i>	35
II. Bactéries et stress environnementaux : cas des bactéries firmicutes.....	39
II.1. La réponse aux stress des microorganismes.....	39
II.2. Les chaperons moléculaires.....	41
II.2.1. Les chaperons moléculaires universels : DnaK et GroEL.....	42
II.2.1.1. DnaK-DnaJ-GrpE.....	42
II.2.1.2. GroEL-GroES.....	43
II.2.2. Les small Hsp	45
II.2.2.1. Structure	45
II.2.2.2. Fonctions cellulaires des sHsp	46
II.2.2.3. Cas de Lo18, unique sHsp de <i>O. oeni</i>	48
II.3. La famille des protéines Clp.....	51
II.3.1. Classification- fonction des protéines Clp	51
II.3.2. Cas particulier de ClpB	53

II.3.3.	Rôles de chaperons moléculaires ClpC et ClpX	55
II.3.4.	Rôles de ClpE et ClpL : Clp-ATPases spécifiques des firmicutes.....	56
II.3.5.	Cas particuliers des Clp-ATPases chez <i>O. oeni</i> : Pas de ClpB ni de ClpE mais deux ClpL !	58
II.4.	<i>Les protéases</i>	60
II.4.1.	ClpP.....	61
II.4.2.	FtsH.....	62
II.4.3.	Lon et ClpQ.....	63
II.4.4.	HtrA.....	64
II.5.	<i>Autres familles protéines de stress</i>	66
II.6.	<i>Mécanismes de régulations de la réponse au stress.</i>	67
II.6.1.	Les régulons de la réponse au stress.....	67
II.6.1.1.	Les six régulons identifiés chez <i>B. subtilis</i>	67
II.6.1.2.	Cas des bactéries lactiques : Corégulation par HrcA et CtsR	70
II.6.1.3.	<i>O. oeni</i> : un cas à part.....	71
II.7.	<i>Activité du répresseur transcriptionnel CtsR et sa régulation</i>	74
II.7.1.	Régulation de l'activité de CtsR chez <i>B. subtilis</i>	74
II.7.2.	Quels mécanismes de régulation de l'activité CtsR chez les bactéries dépourvues de McsA et McsB ?	78
III.	Analyse fonctionnelle des gènes chez <i>O. oeni</i> : une bactérie capricieuse.	82
III.1.	<i>Les différents modes de transferts</i>	82
III.1.1.	Les transferts naturels.....	83
III.1.1.1.	La conjugaison	83
III.1.1.2.	La transduction.....	84
III.1.2.	Les transferts artificiels -l'électroporation	85
III.2.	<i>Les outils génétiques pour l'analyse fonctionnelle des gènes.</i>	86
III.2.1.	Les plasmides	86
III.2.1.1.	Les plasmides natifs chez <i>O. oeni</i>	86
III.2.1.2.	Les plasmides de clonages	90
III.2.2.	Les œnophages	95
III.3.	<i>Alternative à la mutagenèse dirigée : inhibition séquence spécifique par production d'ARN antisens.</i>	95
	Objectifs de la thèse	99
I.	Développement d'un outil moléculaire : approche <i>in vivo</i> de la fonction de <i>hsp18</i>.	101
II.	Caractériser la fonction du répresseur CtsR et les mécanismes de régulation de son activité chez <i>O. oeni</i>.	101

III. Etudier l'impact des gènes d'estérase de <i>O. oeni</i> sur le profil aromatique du vin après FML	102
Résultats	103
I. Etude de la réponse au stress chez <i>O. oeni</i>	105
I.1. Etude du chaperon moléculaire Lo18 et de son rôle in vivo.....	105
I.1.1. Introduction	105
I.1.2. Article I	107
I.2. Caractérisation de CtsR : unique régulateur de la réponse au stress chez <i>O. oeni</i>	117
I.2.1. Introduction	117
I.2.2. Article II	119
II. Etude de l'impact des gènes <i>estA2</i> et <i>estA7</i> de <i>O. oeni</i> sur le profil aromatique du vin après FML	139
II.1. Introduction.....	139
II.2. Article III	141
Discussion-Perspectives	163
I. Etude mécanistique de la réponse au stress de <i>O. oeni</i>	165
I.1. Quels mécanismes contrôlent l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR chez <i>O. oeni</i> ?.....	165
I.2. Le ciblage par ARNas comme alternative à la mutagenèse.....	169
I.3. Développement d'un outil génétique pour l'exploration fonctionnelle des gènes de <i>O. oeni</i>	171
II. Etude de l'impact des gènes estérase de <i>O. oeni</i> sur le profil aromatique du vin après FML	174
Conclusion.....	177
Références bibliographiques	181
Annexe	221

Liste des figures

Figure 1 : Chaînettes de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163.....	11
Figure 2 : Arbre phylogénétique des <i>Lactobacillales</i> construit à partir des alignements concaténés des quatre sous-unités de l'ARN polymérase ADN-dépendante.....	13
Figure 3 : Mécanismes de réaction de décarboxylation et de transport de l'acide L-malique chez <i>O. oeni</i> (Loubiere et al. 1992; Salema et al. 1994; Salema et al. 1996a).	18
Figure 4 : Organisation génétique du locus malolactique de <i>O. oeni</i>	19
Figure 5 : Changements biochimiques intervenant lors de la FML et modifications métaboliques chez <i>O. oeni</i>	20
Figure 6 : Principales voies du métabolisme du citrate aboutissant à la formation du diacétyle..	23
Figure 7 : Réactions de synthèse et d'hydrolyse des esters catalysées par les estérases.	26
Figure 8 : Identification des mécanismes majeurs de résistance et d'adaptation de <i>O. oeni</i> en milieu vin.....	33
Figure 9 : Modèle simplifié du contrôle qualité des protéines cellulaires en conditions optimales (1) ou conditions stressantes (2) (Narberhaus 2002).....	41
Figure 10 : Le complexe DnaKJ-GrpE.....	42
Figure 11 : Le complexe GroEL-GroES.....	44
Figure 12 : Mécanisme d'oligomérisation et d'activité chaperon des sHsps (Sun and MacRae 2005).....	47
Figure 13 : Immuno-localisation par observation microscopique de Lo18 chez <i>O. oeni</i>	48
Figure 14 : Structure en trois dimensions de Lo18 observée en microscopie électronique.....	49
Figure 15 : Modèle de l'oligomérisation dynamique de Lo18 en présence d'éthanol.	50
Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation structurale des sous familles de Clp-ATPases (Frees et al. 2007).....	52
Figure 17 : Différents mécanismes d'action des Clp-ATPases (Doyle and Wickner 2009).	53
Figure 18 : Arbre phylogénétique tracé à partir de l'alignement des séquences peptidiques des Clp-ATPases de classe I	60
Figure 19 : Corégulation par CtsR et HrcA des gènes <i>hsp</i> chez différentes bactéries firmicutes à faible pourcentage en bases GC.	71
Figure 20 : Organisation du régulon CtsR et des gènes induits lors d'un stress (<i>hsp33</i> , <i>htrA</i> et <i>clpX</i>) de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163.....	72
Figure 21 : Représentation en 3D de la structure d'un dimère de CtsR fixé sur une molécule d'ADN.....	74
Figure 22 : Alignement par ClustalW des séquences peptidiques des CtsR des principales bactéries firmicutes dont <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163 et l'arbre phylogénétique déduit de cet alignement..	75
Figure 23 : Modèle de la thermorégulation de l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR chez <i>B. subtilis</i> proposé par (Elsholz et al. 2010).....	77
Figure 24 : Régulation de l'activité de CtsR lors d'un stress oxydatif (Elsholz et al. 2011).....	78
Figure 25 : Organisation de l'opéron ClpC chez différents phylum de bactéries firmicutes à faible %GC (Elsholz et al. 2010; Grandvalet 2011).....	79
Figure 26 : Récapitulatif des mécanismes de régulation de l'activité de CtsR chez les firmicutes.....	81

Figure 27 : Les méthodes naturelles de transfert génétique chez <i>O. oeni</i>	84
Figure 28 : Carte de restriction du plasmide cryptique pRS2 de <i>O. oeni</i> (Mesas et al. 2001).	88
Figure 29 : Organisation génétique de pOENI-1 et de son dérivé pOENI-1v2 (Favier et al. 2012).	89
Figure 30 : Carte du plasmide chimérique pRS7Rep.	90
Figure 31 : Cartes des vecteurs pORI19, pGID701 et de son dérivé pGID052.	91
Figure 32 : Carte du vecteur pSIP409	94
Figure 33 : Photo de bactériophage de <i>O. oeni</i> obtenue au microscope électronique à balayage (Davis et al. 1985).	95
Figure 34 : Stratégie de double recombinaison homologue envisagée pour remplacer l'opéron CtsR de <i>B. subtilis</i> par le gène <i>ctsR</i> de <i>O. oeni</i> (1), par l'opéron <i>ctsR-clpL2</i> (2) ou l'opéron <i>ctsR-clpL1</i> (3)	168
Figure 35 : Perspectives historiques et jalons de l'exploration fonctionnelle des gènes de <i>O. oeni</i>	179
Figure annexe 1 : Alignement des séquences peptidiques des ClpATPases de classe I.	223

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux esters identifiés dans le vin : structure, descripteurs aromatiques et seuils de détection (Swiegers et al. 2005; Sumbly et al. 2010)	25
Tableau 2 : Contraintes physico-chimiques et technologiques rencontrées par <i>O. oeni</i> en milieu vin. (Betteridge et al. 2015).	32
Tableau 3 : Facteurs physico-chimiques influençant l'expression des gènes de <i>O. oeni</i>	38
Tableau 4 : Régulons impliqués dans la réponse au stress chez les fimicutes (Sugimoto et al. 2008)	68
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des principaux plasmides, bactériophages et vecteurs décrits chez <i>O. oeni</i> .	92

Avant-propos

Oenococcus oeni est une bactérie lactique appartenant au phylum des firmicutes majoritairement responsable de la fermentation malolactique (FML) des vins (Lonvaud-Funel 1999). En milieu vin, *O. oeni* évolue dans un environnement combinant des paramètres physico-chimiques extrêmes (pH et température faibles) et la présence de compétiteurs biologiques (levures et flore bactérienne d'altération) à l'origine de la présence de substances inhibitrices de la croissance (éthanol, sulfites, acides gras). Toutes ces conditions constituent un environnement défavorable à la survie et au développement de la bactérie et nuisent à une bonne conduite de la FML. Cependant les conditions drastiques imposées par le vin entraînent la sélection de l'espèce la mieux adaptée : *O. oeni* (Lonvaud-Funel 1999; Bartowsky and Borneman 2011). Les professionnels ont de plus en plus souvent recours à un ensemencement par des levains évitant ainsi un retard de la FML pouvant conduire à une altération des vins. Bien qu'adaptée aux conditions extrêmes du vin, une forte mortalité est observée lors de l'utilisation de *O. oeni* en tant que levain malolactique. En effet, *O. oeni* évolue principalement dans un monde viti-vinicole et se trouve dans des conditions physico-chimiques très différentes de celles décrites en laboratoire et utilisées pour le développement des levains (Cavin et al. 1989; Ribéreau-Gayon et al. 2006; Barata et al. 2012). Ainsi, l'ensemencement direct de ces ferments malolactiques n'apportent pas toujours la solution au problème des retards de FML rencontrés en cave. La mortalité observée est principalement due à une diversité phénotypique entre les différentes souches de *O. oeni* en termes de résistance à l'inoculation dans le vin et de capacité à réaliser rapidement la FML.

D'un point de vue oenologique, l'étude de la réponse adaptative au milieu vin de *O. oeni* a pour buts l'amélioration et la maîtrise des levains malolactiques industriels, tandis que d'un point de vue fondamental, elle a pour but la compréhension de la capacité singulière qu'a *O. oeni* de se développer dans un milieu aussi hostile que le vin. Ainsi *O. oeni* constitue un cas d'étude intéressant dans l'investigation des phénomènes de réponse aux stress environnementaux chez les bactéries lactiques.

La réponse au stress est un phénomène ubiquitaire et hautement conservé à travers l'évolution des espèces. Elle se traduit fondamentalement par la production d'un ensemble de protéines désignées par le terme abusif de protéines de choc thermique ou Hsp (*Heat shock protein*). Comme tout microorganisme, *O. oeni* doit en permanence adapter sa physiologie aux fluctuations physico-chimiques de son environnement. La bactérie tente alors de restaurer un profil

métabolique favorable à sa survie par la mise en place de mécanismes transitoires de réponse aux stress *via* la production de protéines spécifiques codées par les gènes *hsp*. Chez *Bacillus subtilis*, bactérie firmicute particulièrement étudiée, plusieurs mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes ont été décrits impliquant divers régulateurs transcritionnels. Chez *O. oeni*, CtsR constitue l'unique régulateur transcriptionnel identifié à ce jour. Il semble orchestrer la régulation de l'expression de la plupart de gènes *hsp*. Caractérisés chez d'autres genres bactériens, les principaux acteurs régulant l'activité de CtsR sont absents du génome de *O. oeni*.

L'étude de la réponse adaptative de *O. oeni* aux fluctuations de son environnement constitue une des principales thématiques de recherche de l'équipe VALMiS. Au sein de cette thématique, nous pouvons notamment distinguer deux axes : si la caractérisation de la small Hsp (sHsp) Lo18 a déjà fait l'objet de nombreuses études et publications au laboratoire (Jobin et al. 1997; Guzzo et al. 1997; Delmas et al. 2001; Coucheney et al. 2005; Weidmann et al. 2010; Ronez et al. 2012; Maitre et al. 2012; Maitre et al. 2014), il n'en est pas de même concernant l'étude de la régulation de l'expression des gènes induits lors d'un stress (Jobin et al. 1999a; Jobin et al. 1999b; Grandvalet et al. 2005; Beltramo et al. 2006). L'analyse des données du génome de la souche ATCC BAA-1163 a conduit à l'identification du régulateur CtsR, unique chef d'orchestre de la réponse au stress décrit chez cette bactérie (Grandvalet et al. 2005). Cependant l'absence d'outils moléculaires permettant de manipuler le génome de *O. oeni*, limite les travaux d'exploration à l'utilisation de systèmes d'expression hétérologue ou d'expérimentations menées *in vitro*. Malgré la disponibilité des données génomiques, de nombreuses interrogations subsistent concernant la fonctionnalité et la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress de *O. oeni*.

Ces travaux de thèse abordent d'une part la caractérisation de la réponse adaptative de *O. oeni* aux stress incluant l'élaboration d'un outil génétique pour l'exploration fonctionnelle des gènes de *O. oeni* dont l'expression est induite en conditions de stress. Le gène *hsp18* codant la small Hsp Lo18 a été choisi comme cible pour valider l'efficacité du dispositif et proposer une première approche de la caractérisation de la fonction de ce chaperon moléculaire *in vivo*. Puis, la fonction du gène *ctsR*, codant le régulateur majeur de la réponse au stress chez *O. oeni*, a été abordée à l'aide de ce nouvel outil génétique. Les mécanismes de régulation de l'activité de CtsR ont été ensuite appréhendés *via* l'utilisation de la bactérie *B. subtilis* comme une plateforme

d'étude. D'autre part, l'outil génétique, développé au cours de ce travail, a été valorisé par la mise en œuvre d'une étude appliquée à l'œnologie concernant l'évaluation de l'impact de deux estérases de *O. oeni*, EstA2 et EstA7 sur le profil aromatique du vin.

Ce manuscrit présente un premier chapitre bibliographique faisant la synthèse des connaissances acquises sur *O. oeni*, le rôle de la fermentation malolactique sur les propriétés du vin, l'analyse fonctionnelle de ses gènes et les outils disponibles, et enfin sur les protéines de stress et les systèmes régulant l'expression des gènes codant ces protéines. La synthèse bibliographique est focalisée sur les bactéries du phylum des firmicutes et plus particulièrement du groupe des bactéries lactiques. Les résultats de ces travaux de thèse sont présentés sous forme de trois articles scientifiques un accepté (Article I), un soumis (Article III), et un en préparation (Article II). La première partie est consacrée à l'étude de la réponse au stress de *O. oeni* abordant tout d'abord le rôle du chaperon moléculaire Lo18 et sa fonction *in vivo* via la mise au point d'un outil génétique d'expression chez *O. oeni*, puis la fonction et la régulation de l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR. La seconde partie s'intéresse à l'impact des gènes d'estérases de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin. Ce manuscrit est clôturé par une synthèse critique des résultats de ce travail.

Synthèse bibliographique

I. *Oenococcus oeni* et le milieu vin

I.1. *O. oeni* : une bactérie lactique

I.1.1. Propriétés des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, dont fait partie *Oenococcus oeni*, constituent un groupe hétérogène de bactéries à Gram positif rassemblées selon leurs **propriétés fermentaires**. La définition des bactéries lactiques relève davantage de la biologie que de la taxonomie puisque qu'elle ne désigne pas un groupe de bactérie monophylétique. En effet, si la plupart des bactéries lactiques appartient à l'ordre de *Lactobacillales*, un groupe de bactéries Gram à positif non sporulante, certaines appartiennent à l'ordre des *Actinobacteria* (Makarova et al. 2006; Holzapfel and Wood 2012). Elles appartiennent au phylum des **firmicutes** et sont caractérisées par une faible teneur de leur génome en bases Guanine et Cytosine (inférieure à 50%). Elles sont représentées par des coques et des bacilles dont le métabolisme glucidique aussi bien hétérofermentaire qu'homofermentaire aboutit à la formation d'**acide lactique** (Peterbauer et al. 2011). La fermentation est dite hétérolactique ou homolactique selon la diversité des produits finaux. La famille des bactéries lactiques regroupent douze principaux genres : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Stiles and Holzapfel 1997). Traditionnellement utilisées pour la production d'**aliments ou de boissons fermentés** comme les yaourts, les fromages, la charcuterie, la choucroute, le pain, le vin et le cidre, elles jouent un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques des aliments qu'elles fermentent de par leurs **propriétés acidifiantes** mais aussi aromatisantes. En effet, la production d'acide lactique en quantité importante favorise la conservation des produits alimentaires. Les bactéries lactiques présentent ainsi un intérêt industriel considérable.

Outre leur utilisation pour l'élaboration de produits alimentaires fermentés, les bactéries lactiques, majoritairement inoffensives pour l'Homme, sont particulièrement recherchées pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Elles ont successivement été désignées comme étant GRAS « *generally recognised as safe* » par la société américaine *Food and Drug Administration* (FDA) puis QPS « *Qualified Presumption of Safety* » par l'Union Européenne. A la fin du XIX^{ème} siècle, Döderlein décrit pour la première fois un effet bénéfique sur la santé des bactéries lactiques en

proposant que la production d'acide lactique par les bactéries lactiques vaginales inhibe la croissance des pathogènes. Le terme **probiotique** sera ensuite proposé pour désigner « les microorganismes qui, administrés en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique à l'hôte ». Le tractus gastro-intestinal constitue le site d'action privilégié des probiotiques. Ils agissent soit en inhibant la colonisation par des pathogènes, soit en renforçant la barrière épithéliale intestinale ou encore en modulant la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi les espèces dites « probiotiques » les *Lactobacilli* et *Bifidobacteria* sont majoritairement étudiées et constituent un axe de recherche privilégié dans le domaine de la santé (Hirayama and Rafter 2000; Arqués et al. 2015; de Moreno de LeBlanc et al. 2015). Chez *O. oeni*, une **activité immunomodulatrice** a été mise en évidence chez différentes souches isolées du vin (Foligné et al. 2010). L'activité immunomodulatrice mesurée *in vitro* de ces souches de *O. oeni* combinée à la tolérance naturelle de cette bactérie à l'acide, l'éthanol et aux composés phénoliques laissent entrevoir une utilisation possible de *O. oeni* comme « probiotic-like » (Foligné et al. 2010). Malgré la tolérance par les souris de fortes doses de *O. oeni* ($3,5 \times 10^9$ UFC), l'effet bénéfique sur la santé de l'implantation de la bactérie dans le tractus gastro-intestinal reste toutefois à prouver.

1.1.2. L'espèce *O. oeni*

Oenococcus oeni est une bactérie lactique d'intérêt œnologique **acidophile** et **indigène du milieu vin**. C'est une bactérie firmicute, non mobile, agencée en longue chaînette de coques 0,5 à 0,7 µm de diamètre ayant un métabolisme **hétérofermentaire** (Figure 1). La dégradation du glucose par voie hétérofermentaire aboutit à la formation d'acide lactique, de CO₂, d'éthanol, d'acide acétique et de molécules à quatre carbones issues de la voie des pentoses phosphates. Elle est **microaérophile**, **anaérobie-facultative** et ne possède ni catalase, ni cytochrome oxydase. Sa température optimale de croissance se situe entre **20 et 30°C** (Garvie 1967b; Vuuren and Dicks 1993). Comme la majorité des bactéries lactiques, *O. oeni* présente de fortes exigences nutritionnelles. En milieu synthétique FT80m spécialement optimisé pour sa croissance, la bactérie croît lentement en comparaison aux autres bactéries lactiques avec un **temps de génération de 4h** à 30°C (Garvie 1967a; Cavin et al. 1989). A l'instar de la majorité des bactéries lactiques, *O. oeni* est **auxotrophe** pour de nombreux acides aminés (Garvie 1967a; Remize et al. 2006; Terrade and Mira de Orduña 2009). Ses nombreuses voies métaboliques secondaires, notamment la **dégradation du citrate** et la **décarboxylation du L-malate**, réaction

de la fermentation malolactique du vin, expliquent la capacité de *O. oeni* à produire de nombreux arômes (Lonvaud-Funel 1999; Versari et al. 1999).

O. oeni est capable de se développer en milieu vin et possède une remarquable tolérance à de nombreux stress environnementaux. Elle est présente tout au long du processus de fabrication du vin, des baies de raisin aux cuves de vinification et l'environnement viti-vinicole constitue son habitat naturel (Garvie 1986; Bartowsky 2005). Cette bactérie tolère de faibles températures (12°C) et de fortes concentrations en éthanol (14%) et en sulfites (30 mg.L⁻¹) (Britz and Tracey 1990; Guzzo et al. 1998; Bordas et al. 2013). Connue comme l'une des bactéries lactiques les plus acidophiles, elle résiste aux pH faibles atteignant la valeur de pH = 3,5 (Garvie 1967a; Dicks et al. 1995).

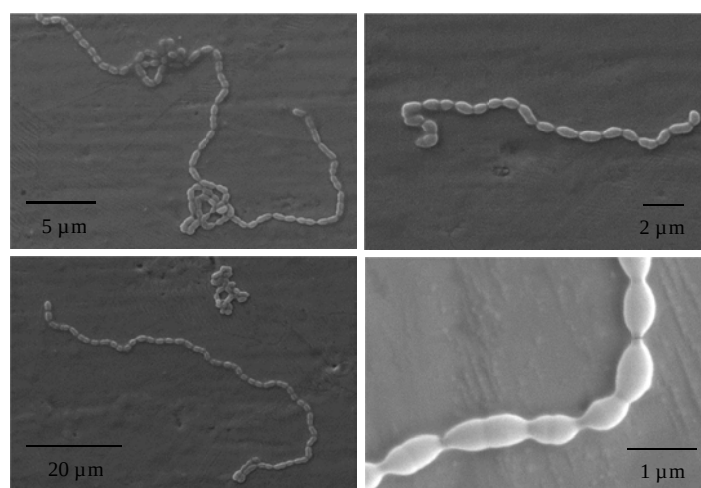


Figure 1 : Chaînettes de *O. oeni* ATCC BAA-1163 observées en microscopie électronique à balayage (Maitre 2012).

Dès les années soixante, la classification de *O. oeni* est sujet à controverse. En 1967, Garvie étudie la croissance et les propriétés fermentaires de dix-neuf coques à Gram⁺ isolés du vin appartenant au genre *Leuconostoc*. Ces souches se distinguent des autres *Leuconostoc* de par leur acidotolérance particulière et leur croissance améliorée par addition de jus de tomate au milieu standard (YCB, *Yeast Citrate Broth*). Garvie suggère alors de les distinguer des autres *Leuconostoc* et propose la nouvelle espèce : ***Leuconostoc oenos*** (Garvie 1967b). Cette nouvelle espèce sera inscrite en 1989 sur « *Approved Lists of Bacterial Names* » (Skerman et al. 1989). Outre leur acidotolérance, les souches étudiées présentaient une meilleure tolérance à la présence d'éthanol (10%, vol:vol) ainsi que des différences fermentaires au niveau du métabolisme glucidique. Elle est ensuite renommée ***Oenococcus oeni*** d'une part par l'étude de son

métabolisme par Dicks et al. et d'autre part suite aux travaux de séquençage et de comparaison des ARN ribosomiaux 16S et 23S effectués par Morse et al. soulignant une forte divergence génétique de cette espèce par rapport à la branche des *Leuconostocaceae* (Dicks et al. 1995; Morse et al. 1996).

Oenococcus vient du grec **oinos** et **kokkus** signifiant littéralement « le coque du vin dans le vin » (Dicks et al. 1995). *O. oeni* appartient à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Leuconostocaceae* (Figure 2) (Makarova et al. 2006). Elle fût longtemps l'unique espèce du genre *Oenococcus*, jusqu'à la mise en évidence récente de deux nouvelles espèces : ***Oenococcus kitaharae*** et ***Oenococcus alcoholitolerans***. *O. kitaharae* est une bactérie lactique non-acidophile isolée à partir du Sōchū, une boisson alcoolisée japonaise issue de la fermentation de féculents par *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger* (Endo and Okada 2006; Borneman et al. 2012). *O. alcoholitolerans* a été isolée de Cachaça, un alcool dérivé de canne à sucre produit au Brésil (Badotti et al. 2014).

Les premiers travaux de séquençage des ARNr 16S des *Leuconostocaceae* ont mis en évidence une position phylogénétique des ARNr 16S de *O. oeni* exceptionnellement éloignée des autres *Leuconostoc*. Cette observation associée à la mise en évidence d'une modification de la composition de ces ARNr 16S au niveau de motifs conservés suggèrent que *O. oeni* est un organisme **tachytélique** c'est-à-dire à évolution rapide (Yang and Woese 1989). Cette hypothèse sera par la suite révoquée par des travaux de phylogénie comparative basée sur le séquençage du gène *rpoC* codant la sous-unité β' de l'ARN polymérase ADN-dépendante (Morse et al. 1996). Si ces travaux confirme la distinction de *O. oeni* par rapport aux autres membres des *Leuconostocaceae*, il ne montre pas une évolution rapide du gène *rpoC* (Morse et al. 1996). Néanmoins, les travaux de génomique évolutive de Makarova et al. ont par la suite souligné par deux fois une évolution rapide de *O. oeni* grâce à l'alignement des séquences des protéines ribosomales puis des quatre sous-unités de l'ARN polymérase ADN dépendante (Figure 2) (Makarova et al. 2006; Makarova and Koonin 2007).

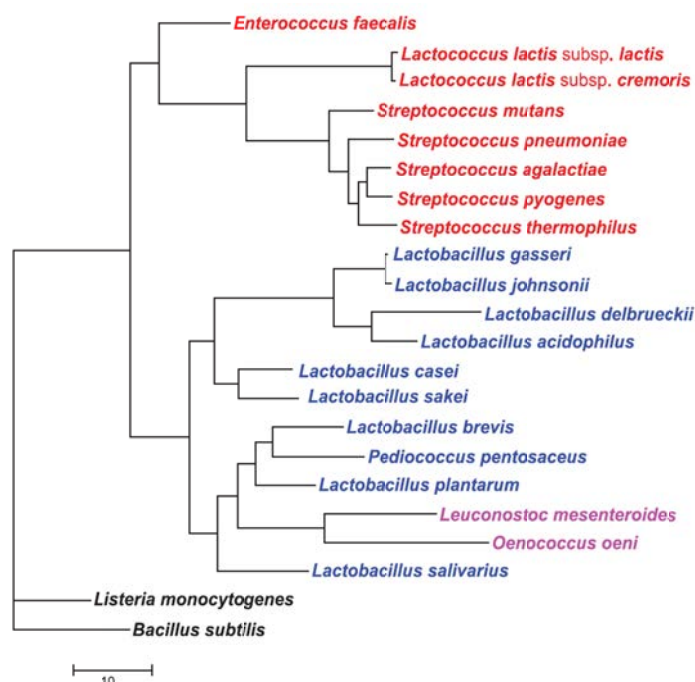


Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Lactobacillales* construit à partir des alignements concaténés des quatre sous-unités de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Arbre non enraciné construit par la méthode des plus proches voisins. Les espèces sont colorées en fonction de leur taxonomie actuelle : Les *Lactobacillaceae* en bleu, les *Leuconostocaceae* en violet et *Streptococcaceae* en rouge (Makarova and Koonin 2007).

Actuellement, les génomes de 62 souches de *O. oeni* ont été séquencés. Le projet de séquençage du génome de la souche PSU-1 de *O. oeni*, initié par le « *Lactic Acid Bacteria Genome Consortium* » (LABG C) (Klaenhammer et al. 2002; Mills 2004) est actuellement le seul disponible annoté et assemblé sur les bases de données (Makarova et al. 2006). Les 61 génomes restants sont disponibles sous forme de contigs non assemblés et non annotés dans la base de données NCBI. Les génomes de ces souches ont une taille comprise entre 1,72 Mb et de 1,90 Mb avec un pourcentage en bases GC d'environ 38% contenant environ 2000 cadres ouverts de lecture (ORFs) (Makarova and Koonin 2007; Borneman et al. 2010). La disponibilité des séquences génomiques de nombreuses souches de *O. oeni* et le développement des techniques de génomique comparative ont pu mettre en évidence un fort degré de diversité allélique chez *O. oeni* (Delaherche et al. 2006; de las Rivas et al. 2009a). L'espèce *O. oeni* présente une importante diversité génomique intra-spécifique vraisemblablement à l'origine de variations phénotypiques significatives entre les souches (Borneman et al. 2010).

En effet, en 2006, les travaux de Makarova et al. soulignent l'absence des gènes *mutS* et *mutL* du génome la souche PSU-1, codant deux protéines clefs impliquées dans le système de

réparation des mutations dues aux mésappariements (MMR pathway : mismatch repair) (Makarova et al. 2006; Makarova and Koonin 2007). L'absence de ce système MMR chez *O. oeni* rendrait la bactérie **hypermutable** et provoquerait une augmentation de la fréquence des mutations spontanées lors de la réplication de l'ADN et un fort taux de transferts horizontaux de gènes (Marcobal et al. 2008). Cette hypermutabilité pourrait expliquer la forte **variation génétique** responsable du **haut degré de polymorphisme** observé parmi les différentes souches de *O. oeni* et rend difficile l'identification d'un ancêtre commun (Delaherche et al. 2006; de las Rivas et al. 2009a; Campbell-Sills et al. 2015).

La comparaison de génomes de souches à potentiels œnologiques différents par la technique d'hybridation génomique soustractive (SH, *genomic subtractive hybridization*) a, par la suite, été utilisée pour élucider les bases génétique des variations intra-spécifiques observées chez *O. oeni* et identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'adaptation aux conditions vins. Six régions à haute plasticité génomique ont pu être identifiées. L'analyse de leur séquence n'a révélé aucune séquence spécifique aux souches hautement performantes (HP). Toutefois, huit gènes localisés dans les régions 2, 4 et 5 sont significativement retrouvés associés aux souches HP. Des motifs d'expression de gènes sont significativement modifiés chez les souches HP après exposition à des stress relatifs au milieu vin. Les régions 2 et 5 ne montrent aucune trace d'éléments mobiles et un pourcentage en bases GC normal tandis que la région 4 montre des traces d'acquisition de gènes par transferts horizontaux. Cette plasticité de génome observée chez *O. oeni* semble donc associée à sa capacité à acquérir de nouveaux gènes et pourrait être utilisée par la bactérie comme une **stratégie d'adaptation** à son environnement (Bon et al. 2009).

Malgré une forte diversité génétique, les dernières analyses phylogénétiques menées chez *O. oeni* ont mis en évidence une **domestication spécifique** des souches issues du vin et du cidre et ont pu classer 50 souches de *O. oeni* en trois groupes phylogénétiques A, B et C. L'existence des groupes A et B a d'abord été mis en évidence par la combinaison de deux techniques : le typage multilocus (MLST : *MultiLocus Sequence Typing*) basée la comparaison de huit gènes et l'électrophorèse en champ pulsé de profil de restriction par l'enzyme NotI (Bilhère et al. 2009). La diversité allélique de ces deux groupes, confirmée par une étude plus large sur 258 souches isolées de régions et de vins différents, suggère une évolution séparée de ces deux groupes de souches de *O. oeni* (Bridier et al. 2010). Les deux clusters A et B diffèrent également en terme de

contenus en éléments *IS30* suggérant un impact de ces séquences d'insertions dans la diversité génétique et dans la capacité d'adaptation des bactéries (El Gharniti et al. 2012). Un troisième groupe C, proche du groupe B, a récemment été identifié et ne comprend qu'une seule souche, IOEB_C52 isolée du cidre (Campbell-Sills et al. 2015).

La souche étudiée au laboratoire VALMiS, a été isolée en 1984 d'un vin rouge bordelais pour son acidotolérance particulière et appartient au groupe B regroupant des souches isolées du cidre et du vin. Initialement appelée *L. oenos* 8413 (Cavin et al. 1989) puis *O. oeni* IOEB-8413, elle a été renommée et référencée dans les banques sous le nom de ***O. oeni* ATCC BAA-1163**. L'Université de Bourgogne a initié le projet de séquençage de son génome en partenariat avec la faculté d'œnologie de l'Université Victor Ségalen (Bordeaux 2). Ce génome est actuellement disponible sous forme de contigs partiellement assemblés et annotés ([NZ_AAUV000000000.1](#) ; Statut Scaffold sur la base de données NCBI). Son génome présente une taille de 1 792 216 bp et comporte 1 835 ORFs.

1.2. *O. oeni* : un ferment malolactique

Le vin est issu d'une biotransformation microbiologique du moût de raisin (jus de raisin issu du pressurage des baies de raisin) par les levures et les bactéries. Le processus de fabrication du vin débute par une première étape de fermentation réalisée par les levures, typiquement *Saccharomyces cerevisiae*, appelée **fermentation alcoolique** (FA). Durant cette étape, les levures fermentent les sucres du moût en éthanol et CO₂ par la voie de la glycolyse (Fleet et al. 1984). Cette étape est parfois suivie d'une fermentation réalisée par les bactéries lactiques du vin, appelée **fermentation malolactique** (FML). Après la FA, les levures ont consommé la majeure partie des sources carbonées et azotées ce qui entraîne une forte mortalité. L'autolyse qui en résulte libère de nombreux facteurs de croissance et nutriments qui permettent la croissance des bactéries lactiques initialement présentes sur les baies de raisin et sur le matériel viti-vinicole (Alexandre et al. 2004).

1.2.1. La fermentation malolactique

De nos jours, la FML est recherchée dans la plupart des vins rouges et certains vins blancs, mais il n'en fut pas toujours ainsi. En effet, au XIX^{ème} siècle, Pasteur décrit les bactéries lactiques du vin comme « des microbes nuisibles » et écrit « les levures font le vin, les bactéries le détruisent » (Pasteur 1866). Les bactéries lactiques du vin et en particulier *O. oeni* doivent leur

réhabilitation comme bactéries positives grâce à la mise en évidence d'une seconde étape de fermentation du vin faisant suite à la FA durant laquelle le L-malate est décarboxylé en L-lactate.

Malgré une grande **diversité microbienne** présente dans le moût de raisin, *O. oeni* **prédomine** et assure la FML. Quatre genres de bactéries lactiques ont été identifiés comme pouvant mener la FML : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Pediococcus*. L'augmentation progressive du taux d'éthanol dans le vin au cours de la FA et la production de substances inhibitrices de la croissance des bactéries lactiques produites par les levures (acide dodécanoïque ou acide décanoïque) aboutit à la sélection de l'espèce la mieux adaptée : *O. oeni* (Bartowsky and Borneman, 2011 ; Lonvaud-Funel, 1999). *O. oeni* représente la majorité des ferments malolactiques commercialisés et est l'espèce la plus communément utilisée pour effectuer la FML.

Bien qu'universellement admis, le terme « fermentation » utilisé pour définir l'étape de dégradation de l'acide malique effectuée par *O. oeni* est **impropre**. En effet, une fermentation désigne une consommation de sucres fermentescibles en absence d'oxygène tandis que la consommation du L-malate correspond davantage à une décarboxylation d'un acide. Les termes « **bioconversion** » et « **biotransformation** » employés dans certaines études semblent mieux adaptés pour la désignation de cette étape (Herrero et al. 2004; Vigentini et al. 2014).

Durant l'étape de FML, *O. oeni* utilise son **enzyme malolactique** (codée par le gène *mleA*) ayant pour co-facteurs le **NAD⁺** et le **manganèse** (Mn^{2+}) pour décarboxyler l'acide-L(-)-malique, un diacide, en acide-L(+)-lactique, un monoacide (Figure 3). Pour 1 g d'acide malique dégradé, seulement 0,67 g d'acide lactique est retrouvé dans le vin.

Selon l'espèce bactérienne, la dégradation de l'acide malique fait intervenir trois enzymes (i) la malate déshydrogénase (MDH) qui catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate, (ii) l'enzyme malique (EM) qui catalyse la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate et (iii) l'enzyme malolactique (EML) qui catalyse la décarboxylation du L-malate en L-lactate. Seule l'enzyme malolactique, également appelée **malate décarboxylase** est capable de convertir le malate en lactate sans passage intermédiaire par le pyruvate et est impliquée dans le processus de la FML (Kunkee 1991). L'EML est présente chez la plupart des bactéries lactiques du vin. Elle se présente en **dimère** formé de deux **sous-unités identiques de 60 à 70 kDa**. Le rôle de ses deux

co-facteurs, indispensables à son activité, n'est pas clairement défini. Cependant, il semble que le NAD^+ soit impliqué dans l'association des deux sous-unités de la conformation active de l'enzyme.

L'étape de FML confère un avantage énergétique à la cellule. Pour une molécule de malate consommée, une molécule de lactate protonnée (LH) est extrusée (Figure 3) ce qui équivaut à l'expulsion d'un proton vers l'extérieur. L'extrusion du lactate diminue le gradient de concentration et augmente le pH intracellulaire (Salema et al. 1996b) ce qui apporte de l'énergie pour l'activation de la F_1F_0 -ATPase produisant de l'ATP. En milieu vin, la glycolyse est stoppée et la FML représente pour la cellule la seule voie de production d'ATP (Cox and Henick-Kling 1989; Salema et al. 1996b).

Le transport du malate dans la cellule nécessite l'intervention d'une **perméase** spécifique des formes anioniques de l'acide malique. Les travaux de Salema et al. décrivent un transport uniport du malate sous forme monoanionique associé à une diffusion passive de l'acide lactique avec le CO_2 (Figure 3) (Salema et al. 1994). La présence du L-Lactate et D-Lactate inhibe l'accumulation du L-malate tandis que la présence du citrate provoque une fuite de L-malate laissant penser à un système d'échange entre le citrate et le malate. Le potentiel de membrane ainsi que le gradient de pH favorise l'accumulation du malate dans la cellule. Des travaux effectués au laboratoire ont montré que la **diffusion passive du malate** au pH du vin (pH3,0-3,5) représente 50% du transport du malate dans la cellule (Figure 3) (Tourdot-Maréchal et al. 1993). Concernant le mécanisme d'extrusion du lactate, deux écoles s'opposent : Loubière et al. proposent un système de symport avec un proton H^+ tandis que Salema et al. proposent un efflux passif de la forme protonnée du lactate (Loubiere et al. 1992; Salema et al. 1994). Compte tenu du pKa de l'acide lactique (3,86) et du pH interne de la cellule (4,5-6,5), la forme protonnée du lactate est minoritaire ce qui rend l'hypothèse du transporteur symportique plus plausible.

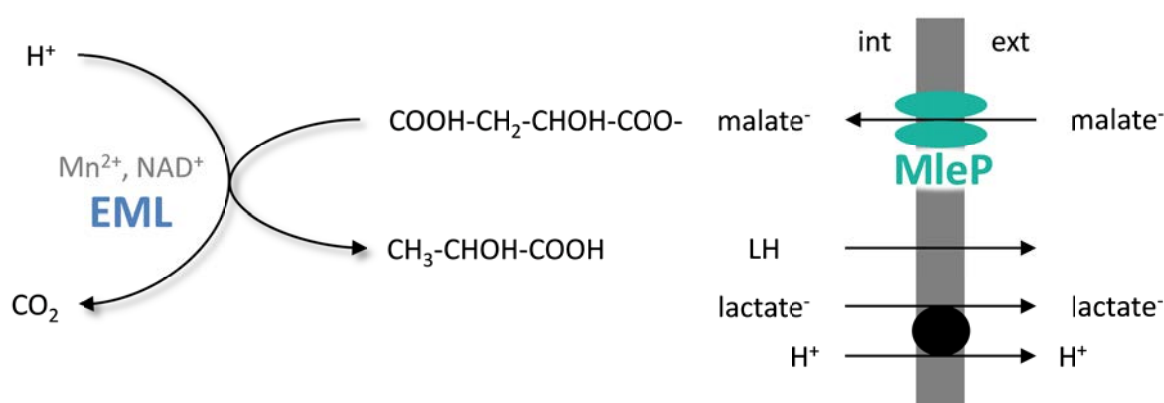


Figure 3 : Mécanismes de réaction de décarboxylation et de transport de l'acide L-malique chez *O. oeni* (Loubiere et al. 1992; Salema et al. 1994; Salema et al. 1996a).

Le métabolisme de l'acide malique nécessite la présence de deux enzymes : l'enzyme malolactique codée par *mleA* et la perméase responsable du transport du L-malate codée par *mleP*. Ces deux gènes sont organisés en un opéron de 2,6 kpb. Un terminateur Rho-dépendant putatif est localisé en aval des deux gènes (Figure 4). En amont de cet opéron se trouve le gène *mleR* codant un régulateur transcriptionnel de type LysR (Labarre et al. 1996b; Labarre et al. 1996a). Le rôle de régulateur de MleR chez *O. oeni* a seulement été suggéré mais pas encore démontré. Chez *Lactococcus lactis*, une espèce phylogénétiquement proche de *O. oeni*, le gène *melR* est essentiel à l'expression de l'opéron (Renault et al. 1989). Egalement caractérisé chez *S. mutans*, cet activateur transcriptionnel possède des sites multiples de fixation et est essentiel à l'acidotolérance de la bactérie (Lemme et al. 2010).

MleR possède un domaine de type HTH (*Helix-Turn-Helix* : Hélice-Boucle-Hélice) caractéristique des domaines de fixation à l'ADN conservés chez de nombreux régulateurs transcriptionnels. Chez des mutants F_1F_0 -ATPase de *O. oeni*, l'absence d'activité malolactique a été corrélée à l'absence de transcription du gène *mleR* suggérant une régulation de l'expression de l'opéron malolactique coordonnée par MleR (Galland et al. 2003). Augagneur et al. ayant constaté une augmentation de synthèse des ARNm de *mleP* en présence de malate lors d'une culture à pH4,5 et à pH3,2 suggèrent quant à eux, un rôle inducteur du malate sur l'expression de l'opéron (Augagneur et al. 2007).

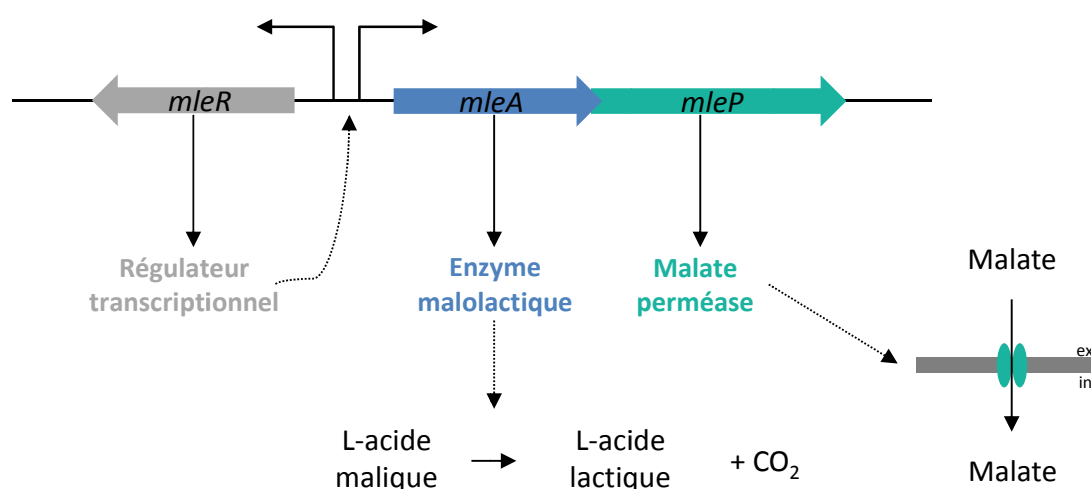


Figure 4 : Organisation génétique du locus malolactique de *O. oeni* (Alexandre et al. 2008; Bartowsky and Borneman 2011).

1.2.2. Impacts positifs de la FML sur les propriétés organoleptiques du vin

Outre la décarboxylation de l'acide malique, *O. oeni* possède une gamme complète de voies métaboliques secondaires pouvant modifier les propriétés organoleptiques du vin. Les nombreux changements provoqués par la FML sur la composition chimique du vin et les modifications métaboliques engendrées chez *O. oeni* sont complexes et difficiles à prédire. La Figure 5 illustre cette complexité et resitue ce travail de thèse. Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés, d'une part, à la notion de stress et à la capacité de la bactérie lactique *O. oeni* à s'adapter aux conditions extrêmes que représente le milieu vin (1); d'autre part, à l'impact des estérases de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin lors de la FML (2) (Bartowsky 2005). L'étude de l'impact du métabolisme secondaire de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin constitue une thématique nouvelle du laboratoire amorcée par ce travail de thèse.

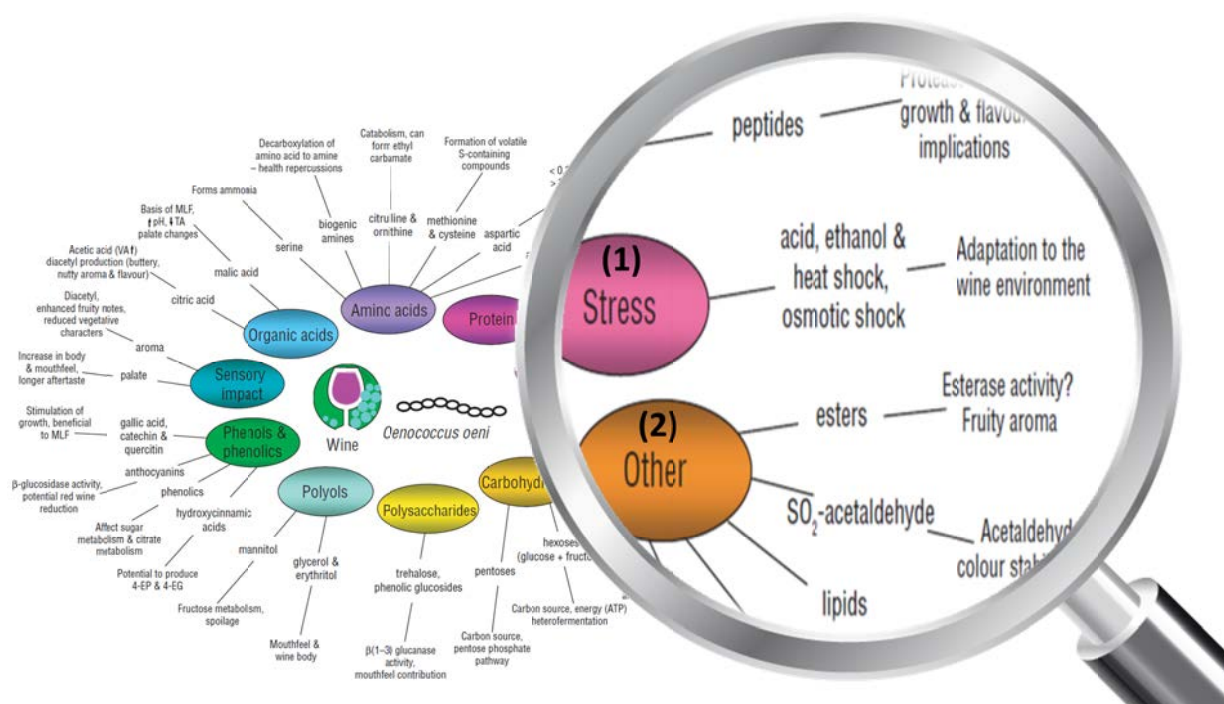


Figure 5 : Changements biochimiques intervenant lors de la FML et modifications métaboliques chez *O. oeni* (Bartowsky 2005). La loupe met en avant les deux axes abordés lors de ce travail de thèse : (1) étude de la réponse au stress de *O. oeni* et (2) étude de l'impact de l'activité estérase de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin.

1.2.2.1. Diminution de l'acidité totale et stabilité microbienne

La FML a pour conséquence directe une **diminution de l'acidité totale** du vin de 0,2 à 0,5 unité de pH et contribue ainsi à la désacidification et l'assouplissement du vin. Cette désacidification biologique du vin est en lien direct avec la teneur initiale des baies de raisin en acide malique ($1-8 \text{ g.l}^{-1}$). Outre cette désacidification du vin, la consommation de l'acide malique et d'éventuels sucres résiduels par *O. oeni* provoque un **appauvrissement en sources carbonées** ce qui confère une excellente **stabilité microbienne au vin** (Bartowsky and Borneman 2011). La croissance des flores levurienne et bactérienne d'altérations du vin sont donc inhibées ce qui limite la production de leur métabolites secondaires. La stabilité microbienne du vin après la FML est également directement induite par l'abaissement du pH qui, d'une part, inhibe la croissance de nombreux genres bactériens, et d'autre part, augmente la part de SO_2 actif dans le milieu. La production de bactériocines par *O. oeni* lors de la FML est une option envisageable qui pourrait expliquer cet équilibre microbien remarquable des vins ayant subi une étape de FML (Alexandre et al. 2008).

1.2.2.2. Modification de la couleur et de la saveur du vin

La **modification de la couleur du vin** est une des conséquences de la FML la plus connue des vinificateurs. Une atténuation et une modification du rouge vif sont très souvent perçues après

FML. Là encore, l'abaissement du pH joue un rôle important en modifiant l'équilibre anthocyanidique du vin. Mais il semble également que les nombreuses **activités glycosidasiques** présentes chez *O. oeni* (α - et β -glucosidase, β -xylosidase, α -rhamosidase α -arabinofuranosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase) soient responsables de l'hydrolyse des anthocyanes mono- ou di-glucosidiques (Grimaldi et al. 2005b). Ces enzymes représentent un véritable intérêt en œnologie de par leur capacité à libérer des composés aromatiques de leur squelette glycosylée (Bartowsky and Borneman 2011).

Une **modification de la saveur du vin**, c'est-à-dire de la perception du vin en bouche est également notable après FML. Le terme d'« assouplissement du vin » est souvent utilisé. Il est principalement dû à l'hydrolyse des tannins par les **tannases** et diminue l'astringence du vin. L'activité tannase des bactéries lactiques du vin est cependant variable selon la souche bactérienne (Matthews et al. 2004; Matthews et al. 2006).

1.2.2.3. Impact de la FML sur le profil aromatique du vin

Le vin est un mélange complexe de composés qui définissent son apparence, son arôme, sa flaveur et ses propriétés organoleptiques. Les composés aromatiques dérivés des baies de raisin apportent une empreinte variétale et donnent une structure de base au profil aromatique du vin. Les changements dus aux métabolismes des levures et des bactéries intervenant lors de la vinification vont, quant à eux, donner un caractère individuel au vin. L'impact de la FML sur le profil aromatique du vin a reçu une attention considérable au cours de ces vingt dernières années (Versari et al. 1999; Bartowsky 2005; Swiegers et al. 2005; Pozo-Bayón et al. 2005). Si Maicas et al. démontrent que la FML provoque des changements notables sur la composition du vin en composés volatiles, Sauvageot et Vivier concluent que ces changements sont trop faibles pour être perçus par un panel de consommateurs (Sauvageot and Vivier 1997; Maicas et al. 1999). Il est toutefois communément admis que la FML a un impact sensoriel sur le vin et ajoute de la complexité au produit fini.

Ces modifications se révèlent principalement dépendantes de la souche bactérienne et du type de vin (cépage, origine géographique). Les bactéries lactiques du vin, et plus particulièrement *O. oeni*, possèdent une gamme complète de voies métaboliques secondaires et d'enzymes qui, en produisant de nombreux composés volatiles secondaires (acétate et éthyle d'esters, alcools supérieurs, composés carbonylés et acides gras volatiles) contribuent à l'amélioration des

propriétés organoleptiques du vin (Siebert et al. 2005; Bartowsky 2005). La compréhension et la caractérisation des gènes de bactéries lactiques d'intérêt aromatique s'imposent d'un point de vue fondamental et ouvrent des perspectives d'application biotechnologique utilisant les bactéries lactiques. L'assemblage du puzzle qui établira les liens entre le phénotype et le génotype permettra de comprendre comment *O. oeni* influe sur la composition du vin

1.2.2.3.a. Métabolisme du citrate : production de diacétyl

Le **diacétyl** est l'arôme le plus important produit par *O. oeni* durant la FML. Malgré la disponibilité du génome de la souche PSU-1 annoté et séquencé, la connaissance des gènes et de leur impact potentiel sur l'arôme du vin reste limitée (Zé-Zé et al. 1998). Les gènes *alsS*, *alsD*, *citE* et *ackA* décrits comme étant responsables de la production du diacétyl, molécule volatile responsable de la note beurrée dans les vins, n'ont été que partiellement caractérisés (Garmyn et al. 1996; Olguín et al. 2009; Olguín et al. 2010). Le diacétyl est une molécule dicétonique apportant une complexité aromatique désirée lorsqu'il est présent à une teneur inférieure à 5 mg.l⁻¹. Au-delà de 7 mg.l⁻¹, son caractère dominant devient indésirable. Ainsi, la sélection de souches produisant de faibles quantités de diacétyl révèlent un réel intérêt œnologique. Parmi les gènes ayant un impact aromatique lors de la FML, cet opéron reste le seul à avoir été cloné et caractérisé. Il est formé de deux gènes dont l'expression est constitutive. Le gène ***alsS*** code une **α -acétolactate synthase** qui catalyse la synthèse de l' α -acétolactate à partir du pyruvate. Le gène ***alsD*** code une **α -acétolactate décarboxylase** qui catalyse la décarboxylation de l' α -acétolactate en acétoïne (Figure 6). Le diacétyl dérive du métabolisme de l'acide citrique et provient d'une **décarboxylation non enzymatique** de l' α acétolactate, lui-même produit par l'action des produits de l'opéron *alsSD* (Figure 6) (Ramos et al. 1995).

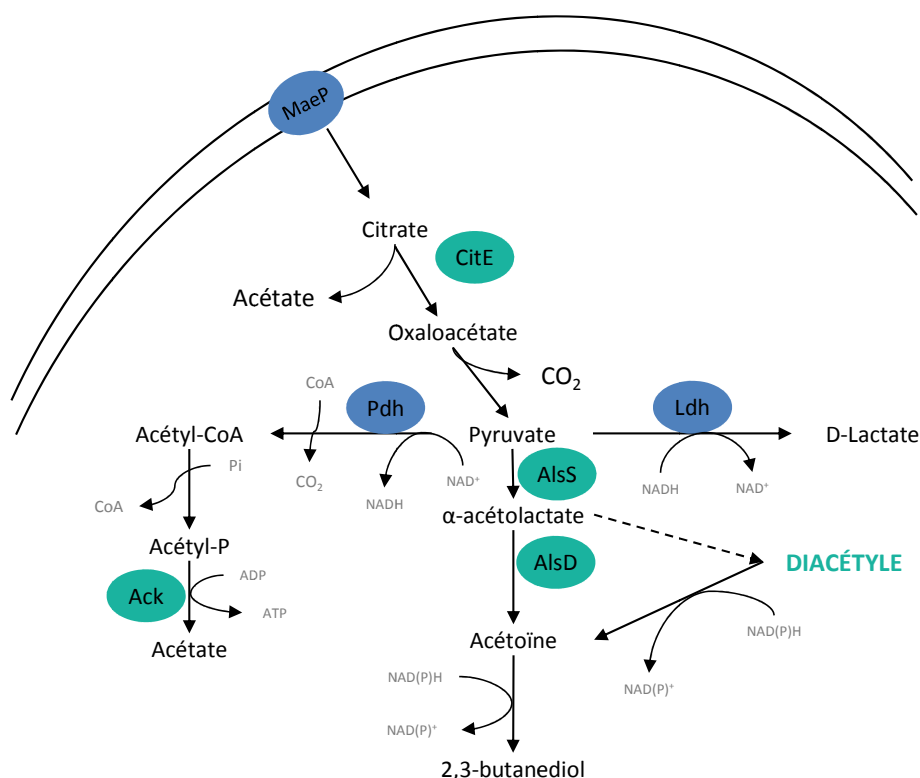


Figure 6 : Principales voies du métabolisme du citrate aboutissant à la formation du diacétyle (Olguín et al. 2009). *citI* – activateur transcriptionnel ; *maeP* – citrate perméase putative ; *citE* – citrate lyase ; *pdh* – pyruvate déshydrogenase ; *ackA* – acétate kinase ; *ldh* – lactate déshydrogenase ; *alsS* – α-acétolactate synthase ; *alsD* – α-acétolactate décarboxylase.

1.2.2.3.b. Métabolisme des esters : les estérases

Après le diacétyle, les **esters**, responsables des **arômes fruités et floraux** des vins jeunes, constituent l'une des plus importantes familles de composés aromatiques dans le vin. La majorité des esters du vins sont produits par les levures durant la FA par catalyse enzymatique utilisant les alcools et l'acétyl-CoA comme substrats ou formés durant le vieillissement du vin par estérification chimique des alcools et des acides (Lilly et al. 2006). L'accumulation enzymatique des esters dans le vin est le résultat d'une balance entre les réactions de synthèse et d'hydrolyse enzymatique catalysées par les estérases (EC 3.1.1.1) mais aussi les alcool acétyltransférases (EC 2.3.1.84) pour les levures (Sumbly et al. 2010).

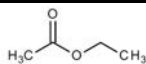
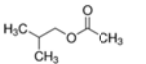
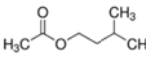
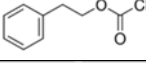
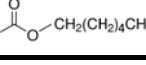
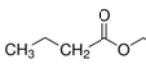
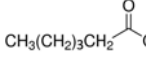
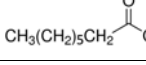
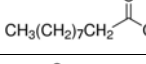
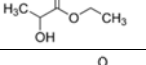
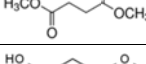
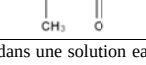
Les esters d'éthyle d'acides organiques (C4-C10), les acétates d'esters d'alcools supérieurs et les esters d'acides sont les principaux esters responsables de l'arôme fruité et floral dans le vin (Tableau 1) (Ebeler 2001; Sumbly et al. 2010).

Les acétates d'alcools supérieurs sont des esters formés à partir de l'acide acétique et d'alcools supérieurs correspondant aux alcools ayant un nombre de carbone plus élevé que l'éthanol ($>2C$). Les esters éthyliques d'acides gras sont dérivés des acides gras butyriques, hexanoïques, octanoïques et décanoïques. Plus leur chaîne carbonée est longue, plus les notes tendent vers des odeurs savonneuses dites « stéariques ». Cependant les esters éthyliques d'acides gras à chaînes carbonées plus longues ($>10C$), trop gras, ne participent pas à l'arôme fruité du vin (Sumby et al. 2010).

Compte tenu du nombre important d'acides et d'alcools dans le vin, le nombre de combinaisons possibles pour la formation d'esters est considérable. Depuis les années 1980, plusieurs études rapportent des modifications dans la concentration en esters suite à la FML comprenant des molécules d'intérêt aromatique telles que l'acétate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle, le lactate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle (de Revel et al. 1999; Delaquis et al. 2000a; Gámbaro et al. 2001). L'**acétate d'éthyle**, formé à partir de l'éthanol et de l'acide acétique est quantitativement l'ester le plus important retrouvé dans le vin. Il participe à l'arôme fruité des vins jeunes lorsqu'il est présent entre $50-80 \text{ mg.ml}^{-1}$. Au-delà de 200 mg.ml^{-1} , le consommateur détecte des odeurs désagréables de type solvant (Swiegers et al. 2005). Le **lactate d'éthyle** ou 2-hydroxypropanoate d'éthyle est l'ester produit en plus grande quantité lors de la FML. Sa production, couplée à la formation d'acide lactique lors de la FML, dépend de l'activité malolactique de la souche de *O. oeni* (Maicas et al. 1999). Avec le diacétyl, il est responsable des notes lactées et beurrées dans le vin et est en partie responsable de l'assouplissement du vin par la FML.

La plupart des esters sont retrouvés à l'état de trace dans le produit fini à des concentrations inférieures au seuil de détection. Cependant, bien qu'ils soient présents en faible quantité dans le vin, les esters participent à la complexité aromatique du vin. Un changement mineur de concentration peut avoir un impact dramatique sur l'arôme du vin. Le profil aromatique du vin associé aux esters dépend non seulement des esters impliqués mais aussi des composés libérés par l'action des estérases, les acides gras et les alcools supérieurs (Sumby et al. 2010). Ainsi, l'**activité estérolitique** des bactéries lactiques, capable d'augmenter ou de diminuer la quantité d'esters présents dans le vin, influence la qualité aromatique perçue par le consommateur et reçoit depuis le début des années 2000 une attention croissante.

Tableau 1 : Récapitulatif des principaux esters identifiés dans le vin : structure, descripteurs aromatiques et seuils de détection (Swiegers et al. 2005; Sumby et al. 2010)

Esters	Descripteurs aromatiques	Structure	Concentration dans le vin (mg.l ⁻¹)	Seuil de détection aromatique dans le vin (mg.l ⁻¹)
ACETATES				
Acétate d'éthyle	Fruité (jusqu'à 100 mg.l ⁻¹), solvant		5,0-6,3	7,5 ^A , 60, 12,27 ^W
Acétate d'isobutyle	Fruité, pomme		Trace-0,17	1,6 ^B
Acétate d'isoamyle	Fruité, banane		0,03-5,52	0,03 ^A -0,16 ^W
Acétate de 2-phényl-éthyle	Floral, rose		0,03-0,39	ND
Acétate d'hexyle	Fruité		Trace-3,90	0,002-0,48 ; 0,67/2,4 ^W
ESTERS D'ETHYLES				
Butanoate d'éthyle	Floral, fruité, fraise		0,07-0,53	0,001 ; 0,02 ; 0,4 ^B
Hexanoate d'éthyle	Fraise, pomme verte, anis		0,15-1,64	0,005 ^A ; 0,08 ^W ; 0,85 ^W
Octanoate d'éthyle	Fruité, fruits mûrs, pomme verte		0,14-2,61	0,005 ^S ; 0,005 ^A ; 0,012 ; 0,58 ^W
Décanoate d'éthyle	Fruité (baies), gras		0,01-0,70	0,2 ^S ; 0,012 ; 0,51 ^W
Lactate d'éthyle	Lacté, savon, beurré		3,05-297,5	0,05-0,2 ; 150 ^W
Succinate de diéthyle	Fruité, ferment, floral		1,21-61,11	ND
4-Hydroxybutanoate d'éthyle	Caramel		6,61	ND

Seuils de détection issues de la revue Sumby et al. 2010 : Les valeurs ont été déterminées dans une solution eau-éthanol (^A, 10% (v/v) ; dans la bière (^B) ; dans le vin synthétique (^S : 11% v/v éthanol, 7 g.l⁻¹ glycérol, 5 g.l⁻¹ acide tartrique, pH3,4) ; et dans le vin (^W).

Bien que de nombreuses études se soient focalisées sur l'activité estérase des levures (Saerens et al. 2006; Lilly et al. 2006), l'**activité estérase des bactéries lactiques d'intérêt œnologique** pendant la FML reste un domaine peu exploré. La majorité des esters du vin est produite pendant la FA par les levures, les bactéries lactiques prennent ensuite le relais et sont capables de moduler le pool d'esters déjà présents (Bartowsky 2005; Pozo-Bayón et al. 2005). Les principales études sur les estérases de bactéries lactiques ont été menées sur des souches issues de l'industrie laitière (Fernández et al. 2000; Fenster et al. 2003b; Esteban-Torres et al. 2014). Quelques auteurs ont d'ores et déjà reporté la présence d'une activité estérase chez des souches de bactéries lactiques d'intérêt œnologique : *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* isolées du vin (Davis et al. 1988a; Matthews et al. 2004; Matthews et al. 2007; Sumbly et al. 2009). Cependant les recherches menées jusqu'à présent sont principalement basées sur l'étude de profil des esters de souches œnologiques en milieu vin ou sur l'étude *in vitro* d'estérases de bactéries lactiques surexprimées chez *E. coli* puis purifiées. L'étude des profils aromatiques de souches œnologiques a essentiellement montré que ceux-ci variaient en fonction du genre et même de la souche utilisée pour la fermentation malolactique du vin étudié.

Les estérases sont capables de catalyser la réaction d'hydrolyse et de synthèse des esters. Ces enzymes appartiennent à la famille V des enzymes bactériennes lipolytiques (Arpigny and Jaeger 1999). Elles présentent communément une triade catalytique composée des résidus Ser, His et Asp/Glu [SHD/E] et d'un motif structural nucléophile de type Gly, X, Ser, X, Gly [GXSXG] avec X désignant un acide aminé variable et S désignant le résidu Sérine actif (Cygler et al. 1993; Sumbly et al. 2010). Ces enzymes peuvent agir en monomères ou en oligomères allant de 25 kDa à 85 kDa. Son mécanisme d'action supposé consiste en la fixation et l'attaque nucléophile du substrat par le résidu sérine actif.

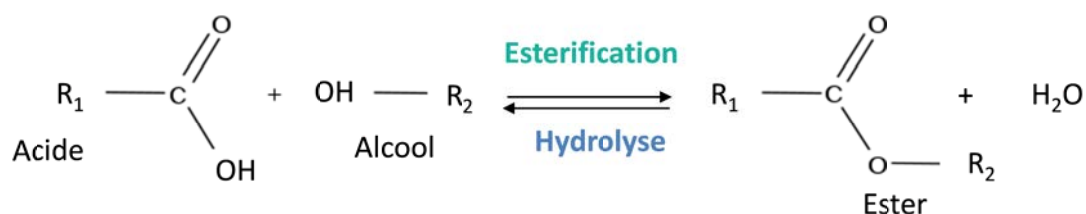


Figure 7 : Réactions de synthèse et d'hydrolyse des esters catalysées par les estérases.

A l'heure actuelle, quatre gènes codant des estérases ont été décrits chez la souche *O. oeni* Ooeni28 commercialisée par Lallemant (nuovi Ceppi Oo2): *estA2*, *estA7*, *estB* et *estC*. Pour trois

d'entre elles, EstA2, EstB et EstC, la plupart des études ont été menées *in vitro* par surexpression des gènes chez *E. coli* puis purification des enzymes (Sumbly et al. 2009; Sumbly et al. 2012a; Sumbly 2013). Ainsi les estérases **EstB et EstC** possèdent une préférence pour les substrats synthétiques à chaîne courte (C2-C6) et présentent un maximum d'activité entre 30°C et 40°C, pH5-5.5 et 8-10% d'éthanol pour EstC et 28% d'éthanol pour EstB. Bien que leur activité enzymatique soit modulée par le pH, l'éthanol et la température, ces deux estérases conservent une activité estérase partielle en conditions vin c'est-à-dire à pH 3,5 et en présence d'éthanol (13%) (Sumbly et al. 2009; Sumbly et al. 2012a). Une activité double de synthèse et d'hydrolyse des esters (réaction inverse, Figure 7) des estérases EstA2 et EstB a récemment été mise en évidence sur substrats naturels (Sumbly et al. 2013). Cette observation semble valider les observations faites sur le vin concernant la capacité des bactéries lactiques à moduler le pool d'esters présents après FA (Matthews et al. 2004; Matthews et al. 2007). Néanmoins, le rôle de cette dualité en milieu vin n'a pas encore été élucidé. Les difficultés de manipulation génétique de *O. oeni* limitent les possibilités de caractériser les gènes d'estérases de cette bactérie d'intérêt œnologique et de comprendre leur rôle dans la modification du profil aromatique du vin pendant la FML. Aucun lien entre le niveau d'expression de ses estérases et leur impact sur le profil aromatique n'a été établi. En outre, les difficultés rencontrées lors de la purification de l'estérase EstA7, du fait de son instabilité *in vitro*, réduisent les possibilités de caractériser cette enzyme (Sumbly et al. 2012b). Pour s'affranchir de ces difficultés de purification et s'approcher au mieux des conditions œnologiques, le développement d'outils génétiques s'impose afin de rendre compte du rôle de ces gènes *in vivo* chez *O. oeni*.

1.2.2.3.c. Autres enzymes d'intérêt œnologique

D'autres enzymes produites par les bactéries lactiques d'intérêt œnologique, ont le potentiel de modifier le profil aromatique du vin pendant la FML. Certains auteurs se sont d'ores et déjà intéressés à ces enzymes à fort potentiel œnologique produites par *O. oeni* : les glycosidases, les tannases, les lipases et protéases (Matthews et al. 2004; Grimaldi et al. 2005a; Grimaldi et al. 2005b; Matthews et al. 2006; Michlmayr et al. 2010; Michlmayr et al. 2012; Michlmayr and Kneifel 2013). Ces enzymes ont en commun la capacité de libérer les composés aromatiques volatiles à partir de précurseurs glycosylés. Les **glycosidases**, constituent les enzymes œnologiques les plus étudiées après les estérases. Ces enzymes sont capables de libérer des composés aromatiques aliphatiques, terpénoïques et norisoprénoïques (Maicas and Mateo 2005;

Spano et al. 2005b; Ugliano and Moio 2005). Comme l'activité estérolytique, l'activité glucosidique varie selon la souche et le vin utilisés (Matthews et al. 2004). *O. oeni* fait, à présent, partie des bactéries lactiques les plus étudiées en ce qui concerne ses activités β -glucosidiques (Michlmayr and Kneifel 2013). La **β -glucosidase** de *O. oeni* codée par le gène *bgl* a été exprimée chez *E. coli* et partiellement caractérisée (Michlmayr et al. 2010). L'enzyme présente des caractéristiques proches des β -glucosidases isolées de *L. brevis* et *L. mesenteroides*. Son pH optimal est compris entre 5 et 5,5 et une activité glycosyltransférase a été détectée en présence d'éthanol (Michlmayr et al. 2010). Même si les glycosidases commercialisées dans le domaine vinicole sont à l'heure actuelle extraites des champignons, la recrudescence des études sur les glycosidases des bactéries lactiques a montré qu'elles étaient davantage adaptées aux conditions physicochimiques du vin (pH et température faibles) ce qui en fait les prochaines cibles de développement de préparations de glycosidases œnologiques (Michlmayr et al. 2010). En effet, les glycosidases issues de champignons présentes dans les préparations pectolytiques sont partiellement inhibées en conditions vin, particulièrement par le glucose et l'acidité (Maicas and Mateo 2005)

1.2.3. Impacts négatifs de la FML

Outre son impact positif sur la FML, le métabolisme secondaire des bactéries lactiques durant la FML peut avoir un impact néfaste sur l'arôme du vin notamment *via* la production de phénols volatils, d'indole, d'amines biogènes et de carbamate d'éthyle (Sumby et al. 2014).

Les **phénols volatils** sont des molécules responsables d'arômes indésirables de sueur de cheval majoritairement produites par la levure d'altération du vin *Brettanomyces bruxellensis*. Cependant, il semble que les bactéries lactiques soient également capables de produire 4-éthylphénol et du 4-vinylphénol par décarboxylation des acides phénols et contribuer au caractère animal indésirable du vin (Silva et al. 2011).

Le **métabolisme des acides aminés** peut être problématique car il peut être à l'origine de molécules néfastes d'un point de vue de la santé du consommateur mais aussi d'un point de vue aromatique. En effet, la décarboxylation de l'ornithine, l'histidine, la tyrosine et la lysine aboutit à la libération des principales **amines biogènes** du vin : la putrescine, l'histamine, la tyramine et la cadavérine au cours ou après la FML. Ces amines biogènes sont responsables d'effets néfastes sur les consommateurs : symptômes allergiques, maux de tête, nausée selon la sensibilité de

l'individu (Sumby et al. 2014). Certaines amines biogènes (cadavérine, putrescine) peuvent créer des masques olfactifs et diminuer la qualité sensorielle des vins. L'origine de ces amines biogènes dans le vin est particulièrement bien documentée (Lonvaud-Funel 2001; Costantini et al. 2009). Elles sont le résultats du métabolisme des décarboxylases des microorganismes indigènes présents sur les baies de raisins ou des microorganismes d'altération du vin (Halász et al. 1994). Comme l'activité estérase, l'activité décarboxylase des bactéries lactiques dans le vin varie en fonction de la souche et des pratiques œnologiques (Coton et al. 1998; Guerrini et al. 2002; Marcobal et al. 2006; Spano et al. 2010). Les gènes codant ces décarboxylases étant généralement portés par des éléments mobiles ou des plasmides, leur présence est donc souche-dépendante. *O. oeni* contribue relativement peu à la production d'amines biogènes dans les vins voire pas du tout (Spano et al. 2010; Garcia-Moruno and Muñoz 2012). Vraisemblablement, issu du métabolisme du tryptophane, l'**indole** peut être produit par les levures en fin de FA et par les bactéries lactiques durant la FML (Arevalo-Villena et al. 2010; Sumby et al. 2014). L'indole, associé aux arômes de plastiques, est principalement rencontré dans des vins dont la FML est inachevée. Sa formation par les bactéries lactiques lors de la FML n'est pas encore totalement comprise. Le **carbamate d'éthyle** (CE) est une molécule carcinogène issue du catabolisme incomplet de l'arginine. La dégradation incomplète de l'arginine provoque l'accumulation de produits intermédiaires (citrulline et carbamate phosphate) pouvant réagir avec l'éthanol du milieu et former le carbamate d'éthyle. Trois gènes, agencés en opéron sont impliqués dans le catabolisme de l'arginine : *arcA arcB* et *arc*. La concentration en CE dans le vin après FML est de 3 µg.l⁻¹ et augmente durant le vieillissement.

1.3. Mécanismes d'adaptation de *O. oeni* aux conditions vins

1.3.1. Contraintes techniques et physicochimiques

1.3.1.1. Qu'est-ce qu'un stress ?

Le terme « stress » vient du latin *stringere* qui signifie « serrer, comprimer, resserrer ». En vieux français, « *estrece* » signifiait « étroitesse, oppression ». Il désigne l'ensemble des facteurs environnementaux qui imposent des contraintes à un organisme. A l'échelle d'une bactérie, le stress est souvent assimilé à un état causé par une déviation des conditions dites « normales » et par une modification du métabolisme dit « normal ». Cependant, la notion de « normal » appliquée à l'évolution d'une cellule reste difficile à définir (Booth 2002). Ainsi la notion de

stress environnemental pourrait désigner toutes les modifications de conditions environnementales (nutritionnelle, osmotique, thermique...) ayant une influence sur le taux de croissance des bactéries. De telles modifications conduisent la cellule à tenter de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à sa survie, ou bien à une croissance plus rapide. Les conditions optimales de croissance sont propres à chaque individu et sont définies comme les conditions environnementales permettant à la bactérie la croissance la plus rapide. Cependant, se pose alors la question suivante : ces conditions sont-elles optimales d'un point de vue métabolique et énergétique pour la bactérie ? Les habitats naturels des bactéries représentent rarement les conditions environnementales optimales décrites en laboratoire. Ainsi, *O. oeni* qui évolue dans un monde viti-vinicole avec pour habitat principal les baies de raisin, les cuveries et le vin, se trouve dans des conditions physico-chimiques très différentes de celles décrites en laboratoire (Cavin et al. 1989; Zhang and Lovitt 2005; Ribéreau-Gayon et al. 2006; Barata et al. 2012).

1.3.1.2. Contraintes physico-chimiques et techniques du milieu vin

Dans un contexte œnologique, nous pouvons distinguer les contraintes d'ordre biochimiques, physiques ou chimiques inhérentes aux propriétés du vin, des contraintes technologiques liées au mode de vinification ou aux interactions avec les partenaires biologiques. En milieu vin, *O. oeni* évolue dans des conditions physico-chimiques rigoureuses : pH faible (2,5 – 3,5), température basse de la cave (12-20°C) et présence de compétiteurs biologiques (levures) à l'origine de substances inhibitrices de la croissance telles que les acides gras (acide décanoïque et dodécanoïque), l'éthanol, le 2-phényléthanol et les sulfites (Tableau 4). Le mode de vinification constitue, quant à lui, une contrainte de nature technique à la croissance de la bactérie. Notamment, l'étape de clarification parfois employée avant la FML engendre l'élimination d'une partie des bactéries lactiques et une partie des nutriments disponibles de par l'élimination des levures autolysées.

Toutes ces contraintes sont autant de facteurs supplémentaires limitant le développement de la bactérie dans son environnement. Lors d'un stress, une **réponse physique** de la cellule se met immédiatement en place et se traduit par une modulation de la fluidité membranaire, l'activation de transports membranaires et une dénaturation protéique. Elle se distingue de la réponse plus tardive qui nécessite une **modification de l'expression du génome**. Les mécanismes

moléculaires ainsi mis en place par la bactérie pour tenter de s'adapter aux fluctuations de son environnement incluent la **régulation de l'expression de gènes** dont les produits sont nécessaires à la résistance ou la survie de la bactérie aux conditions non optimales. Ainsi, **comprendre** les effets d'un stress et **élucider** les mécanismes de régulation répondant à celui-ci, constituent deux étapes incontournables nécessaires à la **maîtrise de l'impact** de ce stress sur la bactérie. Toutefois, il est important de noter que la réponse à un stress sera d'autant plus efficace que le microorganisme se trouvera dans un état physiologique favorable. Ainsi, un microorganisme en phase stationnaire de croissance ou ayant cessé de croître est mieux protégé d'un stress qu'un microorganisme en phase exponentielle. Lors de la phase stationnaire de croissance, consécutive à un stress nutritionnel, un **mécanisme général de réponse au stress** est mis en place, dressant une barrière préventive et préparant la cellule aux éventuels stress à venir sans qu'elle y ait été nécessairement exposée.

O. oeni reste incontestablement la bactérie lactique la **mieux adaptée au milieu vin**. Comme tout microorganisme soumis à un stress environnemental, elle tente de restaurer un profil métabolique nécessaire au maintien de ses fonctions et de son intégrité membranaire (homéostasie cellulaire) par la mise en place de **trois mécanismes majeurs** caractérisés et représentés Figure 8 : (i) la régulation de son pH interne (pH_{int}), (ii) la réponse générale aux stress environnementaux et (iii) le maintien de son intégrité membranaire. Ces mécanismes moléculaires de réponse au stress mis en jeu par *O. oeni* sont complexes et encore mal connus. Leur étude constitue l'un des principaux axes de recherche de l'équipe VALMiS. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette thématique et s'intéresse tout particulièrement aux mécanismes moléculaires de réponse générale au stress de *O. oeni*.

Tableau 2 : Contraintes physico-chimiques et technologiques rencontrées par *O. oeni* en milieu vin. (Betteridge et al. 2015)

Contraintes	Origine	Conditions optimales	Conditions oenologiques	Effets sur <i>O. oeni</i>	Références
Ethanol	Produit par les levures pendant la FA	Stimulation de la croissance jusqu'à 5%	12-15% (v/v)	Modification de la fluidité membranaire et de la structure membranaire	(Da Silveira et al. 2002; Da Silveira et al. 2003; Da Silveira et al. 2004; Da Silveira and Abee 2009)
pH faible	Acidité des baies de raisins et intervention du vinificateur	4,8-5,5	2,5-3,5	Réduction du taux de croissance et optimisation de la consommation de l'acide malique	(Tourdot-Maréchal et al. 1999)
Température faible	Température ambiante de la cave inférieure à la température optimale de croissance de <i>O. oeni</i>	25°C	12-20°C	Diminution du taux de croissance et de la durée de la phase latence	(Betteridge et al. 2015)
SO ₂	Production par les levures au cours de la FA. Ajout pour prévenir la croissance des microorganismes d'altérations durant la vinification	0 mg.l ⁻¹	10-70 mg.l ⁻¹	Réduction de l'activité ATPase et de la viabilité cellulaire	(Carreté et al. 2002)

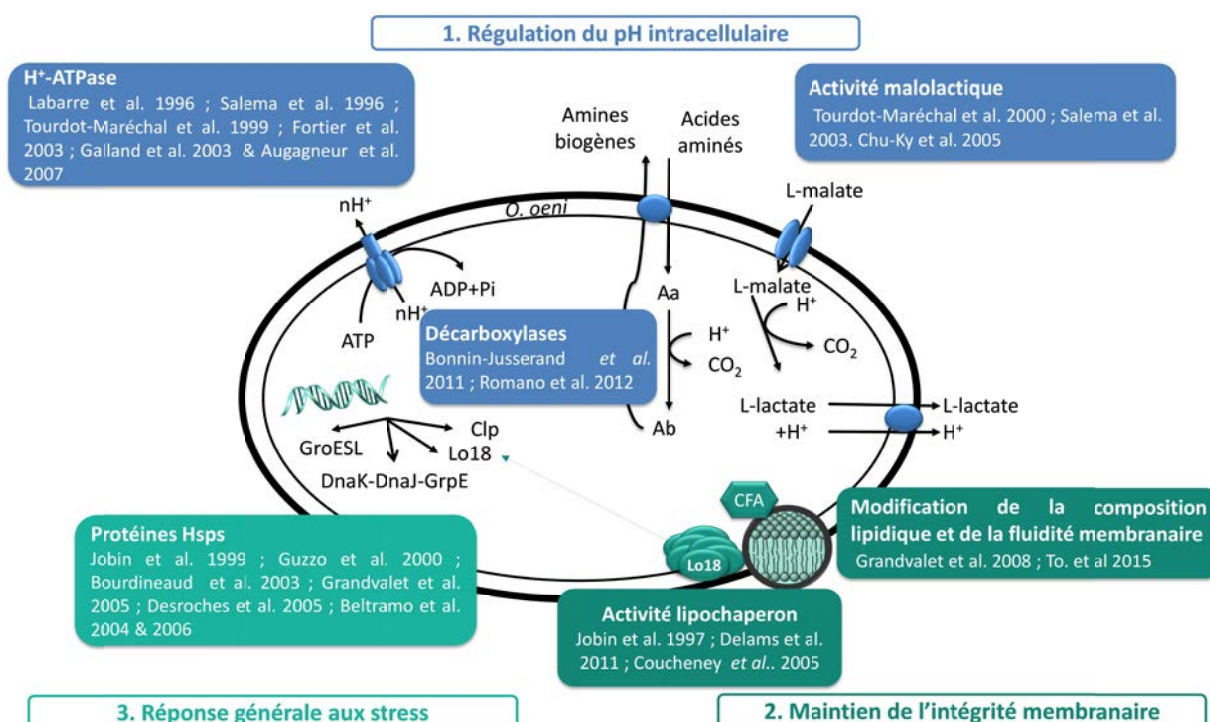


Figure 8 : Identification des mécanismes majeurs de résistance et d'adaptation de *O. oeni* en milieu vin.

1.3.2. Mécanismes d'adaptation de *O. oeni* dans le milieu vin

1.3.2.1. La régulation de pH intracellulaire

Lors d'un stress acide ou tout autre stress à l'origine d'une modification du pH environnemental entraînant une chute du pH_{int} de la bactérie, *O. oeni* est capable de mobiliser différentes machineries enzymatiques lui permettant de maintenir son pH_{int} telles que l'enzyme F_1F_0 -ATPase (Tourdot-Maréchal et al. 1999; Galland et al. 2003; Fortier et al. 2003), l'enzyme malolactique (Augagneur et al. 2007) et certaines acides aminés décarboxylases (Bonnin-Jusserand et al. 2011; Romano et al. 2012). Ces mécanismes sont à l'origine d'une force proton motrice et d'une variation de pH (ΔpH) qui contribuerait à la survie de *O. oeni* en milieu acide (Figure 8).

L'enzyme **F_1F_0 -ATPase**, associée aux **décarboxylases** joue un rôle prépondérant dans le maintien du pH_{int} et de la force proton-motrice de la cellule. Ainsi l'entrée de la forme monoanionique l'acide L-malique, sa décarboxylation en acide L-lactique et l'efflux de ce dernier aboutissent à la consommation d'un proton intracellulaire (Labarre et al. 1996b; Labarre et al. 1996b; Salema et al. 1996b; Salema et al. 1996a). Le déséquilibre protonique créé de part et d'autre de la membrane par l'activité malolactique, génère une force proton motrice utilisée par la

F₁F₀-ATPase. Cette dernière fonctionne alors en sens inverse et synthétise de l'ATP. Un lien entre une activité H⁺-ATPasique réduite et une activité malolactique inexistante a pu être mis en évidence chez des mutants acidosensibles de *O. oeni* et semble jouer un rôle crucial dans les mécanismes d'acidorésistances de *O. oeni* (Tourdot-Maréchal et al. 1999; Galland et al. 2003). L'activité de la F₁F₀-ATPase est également inhibée par la présence de sulfites dans le vin, limitant ainsi la capacité de la bactérie à maintenir son pH_{int} (Carreté et al. 2002). D'autres décarboxylases impliquées dans le métabolisme des acides aminés contribuent également à la régulation du pH_{int} par la libération de composés basiques tels que **les amines biogènes**. Ainsi la réaction de décarboxylation de l'ornithine, la tyrosine et l'histidine par l'ornithine décarboxylase (ODC), la tyrosine décarboxylase (TDC) et l'histidine décarboxylase (HDC) mènent à libération respective de la putrescine, la tyramine et l'histamine (Bonnin-Jusserand et al. 2011; Romano et al. 2012). L'échange membranaire de l'acide aminé et l'amine biogène conduit à la formation d'un gradient de proton et donc d'une force proton-motrice génératrice d'énergie.

1.3.2.2. Maintien de l'intégrité membranaire

Lors d'un stress, la **membrane cellulaire** constitue la première barrière physique. De par sa constitution lipidique, elle subit une modification instantanée de sa fluidité qu'elle doit cependant maintenir suffisante pour conserver la fonctionnalité des protéines enchâssées dans la membrane telles que les transporteurs ou la F₁F₀-ATPase. Divers stress peuvent affecter la fluidité membranaire d'une cellule : modulation de la température, du pH, présence d'éthanol.... Différents mécanismes permettant à la bactérie le maintien de son intégrité membranaire ont été décrits tels que la synthèse *de novo* d'acides gras (Lu and Rock 2006) ; la désaturation-insaturation ou la modification des acides gras par le jeu de saturases et désaturases (Denich et al. 2003) et la cyclisation des acide gras insaturés par la CFA synthase (Cronan 2002).

Chez *O. oeni*, une modification de la composition en acides gras membranaires en conditions sublétales (éthanol 8% ou pH 3,5) a été mise en évidence (Grandvalet et al. 2008). Cette modification se traduit principalement par la diminution du ratio acides gras insaturés/acides gras saturés et la formation d'acides gras cyclopropanes (CFA : *Cyclopropane Fatty Acids*). Les CFAs sont produits par une modification post-synthétique des acides gras insaturés par une cyclase appelée **CFA synthase** codée par le gène *cfa*. La fonctionnalité du gène *cfa* de *O. oeni* a été abordée par complémentation hétérologue d'une souche *E. coli* *cfa*-déficiente (Grandvalet et al.

2008) puis d'une souche *L. latiss* subsp *cremoris* *cfa*-déficiente (To et al. 2015). La restauration partielle du phénotype des souches parentales suggère une particularité de la Cfa synthase de *O. oeni* liée à une préférence de substrat ou aux conditions environnementales imposées par les souches hétérologues (pHint, accessibilité du substrat...). Néanmoins, l'augmentation du taux des transcrits du *cfa* de *O. oeni* en conditions de stress acide ou éthanolique associée à l'augmentation du taux de CFA membranaires conforte la fonctionnalité et l'implication de ce gène dans le maintien de l'intégrité membranaire en réponse à des stress mimant les conditions œnologiques. Ces travaux suggèrent également une régulation transcriptionnelle de ce gène comme précédemment décrit chez *E. coli* (Wang and Cronan 1994; Cronan 2002)..

Lo18 pourrait également avoir un rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire en conditions de stress en s'associant aux lipides membranaires (Coucheney et al. 2005b). Le rôle de cette Small Hsp (sHsp) sera abordé plus en détails dans la partie II de la synthèse bibliographique.

1.3.2.3. Réponse générale aux stress de *O. oeni*

La réponse au stress est un phénomène ubiquitaire et hautement conservés à travers l'évolution des espèces. Elle se traduit par la production d'un ensemble de protéines désignées par le terme protéines de choc thermique ou Hsp (Heat shock protein). Comme tout microorganisme, *O. oeni* doit en permanence adapter sa physiologie aux fluctuations physico-chimiques de son environnement.

Les techniques d'ensemencement direct des ferments malolactiques n'apportent pas toujours la solution au problème aux retards de FML rencontrés en cave. Des stratégies de préadaptation par des traitements préalables à 42°C (Guzzo et al. 1994) ou des cultures en présence d'éthanol (Da Silveira et al. 2002), effectuées dans le but d'induire l'expression des gènes impliqués dans la survie de *O. oeni* en milieu vin, permettent d'obtenir un meilleur taux de survie après réensemencement en conditions vins. Ces gènes constituent les **marqueurs génétiques d'intérêt** qui rendent compte de l'état physiologique de la cellule. Leur caractérisation est une étape incontournable pour envisager l'amélioration des ferments malolactiques mais aussi pour élucider des mécanismes moléculaires mis en jeu par la bactérie en conditions de stress. La sHsp Lo18 constitue la première protéine de stress identifiée chez *O. oeni* grâce à la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions (2D SDS-PAGE) (Guzzo et al. 1997). Puis les données issues du séquençage du génome de la souche ATCC BAA-1163 de

O. oeni, étudiée au laboratoire, a permis l'identification et la caractérisation de nombreux gènes codant des protéines ubiquitaires intervenant dans la réponse aux stress de la bactérie dont l'expression est induite lorsque les cellules sont soumises à un stress environnemental (thermique, acide et présence d'éthanol) (Tableau 3). L'étude de l'expression différentielle par **RTqPCR** des différents gènes identifiés a montré une induction des gènes *trxA*, *clpL1*, *clpL2*, *hsp18* lors d'une culture avec passage de pH5,3 à pH3,5 (Beltramo et al. 2006). La disponibilité de la séquence du génome a également permis l'identification du régulateur transcriptionnel CtsR par homologie avec *B. subtilis*. Actuellement, CtsR constitue l'unique régulateur de l'expression des gènes induits lors d'un stress décrit chez *O. oeni*. L'utilisation de fusions transcriptionnelles entre les régions promotrices des gènes potentiellement reconnues par CtsR et le gène rapporteur de la β -galactosidase a permis de montrer que l'expression des gènes *hsp18*, *clpP-clpL1*, *clpL2*, *ctsR-clpC*, *grpE-dnaK-cbpA* et *groES-groEL* est réprimée par CtsR en conditions optimales de croissance. Ces gènes constituent le régulon CtsR de *O. oeni* (Grandvalet et al. 2005). Il est intéressant de noter que les gènes étudiés par Beltramo et al. ne présentent pas le même profil d'expression alors que la plupart d'entre eux (*clpL1*, *clpL2*, *hsp18*, *grpE*, *groES*, *ctsR* et *clpP*) font partie du régulon CtsR (Grandvalet et al. 2005; Beltramo et al. 2006). Ce phénomène pourrait être expliqué pour l'opéron *clpP-clpL1* par la mise en évidence d'un promoteur intergénique et d'une expression différentielle de ces gènes (Beltramo et al. 2004a).

Les travaux de transcriptomique de Olguín et al. menés sur la souche PSU-1 ont récemment mis en évidence l'implication de ces gènes dans un contexte œnologique en montrant que les souches les plus performantes en condition vin avaient un niveau d'expression relatif des gènes dits « de stress » (*hsp18*, *clpP* et *ctsR*) plus élevé que les autres souches. Les gènes *ctsR*, *hsp18* et *clpX* sont surexprimés durant toute la durée de la FML tandis que les gènes *clpP*, *cfa* et *trxA* sont préférentiellement surexprimés à la fin de la FML (Olguín et al. 2010).

La protéomique a également permis l'identification des protéines impliquées dans l'adaptation de *O. oeni* en conditions vin. Ainsi, Da Silveira et al. montrent que *O. oeni* modifie le profil de ses protéines membranaires et cytoplasmiques en réponse à la présence d'éthanol dans le milieu de culture (Da Silveira et al. 2004). En effet, la présence d'éthanol (8%) provoque un arrêt de la synthèse des protéines membranaires tandis que le taux de protéines potentiellement associées à la membrane augmente ce qui suggère que les protéines cytoplasmiques pourraient stabiliser la

membrane en réponse à un stress éthanol déstabilisant l'équilibre membranaire. Ce phénomène, déjà décrit chez *O. oeni* dans le cas de Lo18 (Coucheney et al. 2005b) ou chez *E. coli* pour le chaperon GroEL (Török et al. 1997) suggère une interaction entre lipides et protéines. La modification de l'hydrophobicité des protéines cytoplasmiques par la présence d'éthanol pourrait expliquer l'augmentation d'affinité de ces protéines pour la membrane et le fort taux de protéines associées à la membrane décrit dans les cellules cultivées en présence d'éthanol (Da Silveira et al. 2004). De même, la fraction cytosolique du chaperon moléculaire DnaK diminue lors d'un choc éthanol suggérant un recrutement à la membrane (Olguín et al. 2015). Les travaux de Cecconi et al. montrent des différences de performances entre les cellules adaptées et non adaptées principalement imputables à des différences d'expression de protéines spécifiques impliquées dans la réponse au stress et le métabolisme des acides aminés et des sucres. De plus, les auteurs montrent que les cellules pré-adaptées par une étape de culture en présence d'éthanol ont une meilleure survie après inoculation en vin (Cecconi et al. 2009). Récemment, Olguín et al. ont étudié les effets d'un choc éthanol (12%) sur la souche *O. oeni* PSU-1 en combinant une approche transcriptomique et une approche protéomique. Ces travaux montrent les limites de la protéomique appliquée à *O. oeni* en conditions vin. En effet, l'analyse transcriptomique met en évidence une expression différentielle des gènes codant les protéines associées à la membrane cependant l'approche protéomique permet seulement l'analyse du protéome soluble. De plus, Mohedano et al. montrent que l'approche protéomique permet seulement d'étudier 10% du protéome théorique (Mohedano et al. 2014). De même concernant l'approche transcriptomique, parmi les gènes étudiés, seuls deux affichent le même comportement au niveau génétique et protéique. Les deux approches s'accordent sur le fait que la membrane constitue le site majeur de la réponse cellulaire en cas de choc éthanol et leur association semble indispensable pour la compréhension totale des mécanismes d'adaptation de *O. oeni* aux conditions physico-chimiques du vin. A noter que l'approche protéomique semble toutefois plus séduisante, à conditions d'optimiser les conditions d'extraction, car elle rend compte des protéines réellement disponibles et utilisées par la cellule pour sa survie. Tandis que la transcriptomique n'illustre pas les éventuelles étapes de régulation post-transcriptionnelles subi par le transcriptome de la cellule et la stabilité des protéines.

La réponse générale au stress, faisant partie intégrante de ce travail de thèse, sera détaillée dans la partie II de cette synthèse bibliographique.

Tableau 3 : Facteurs physico-chimiques influençant l'expression des gènes de *O. oeni*

Gènes	Nature du stress					Références
	Phase de croissance	42°C	Ethanol	pH3.5	Autres	
<i>hsp18*</i>	stationnaire	+	+	+	/	(Guzzo et al. 1997; Desroche et al. 2005; Beltramo et al. 2006)
<i>trxA</i>	-	+	ND	+	+(H ₂ O ₂)	(Jobin et al. 1999a; Beltramo et al. 2006)
<i>clpX</i>	exponentielle	+	ND	-	/	(Jobin et al. 1999b; Desroche et al. 2005)
<i>tig</i>	exponentielle	-	ND	ND	/	(Jobin et al. 1999b)
<i>ftsH</i>	ND	+	-	ND	+(NaCl)	(Bourdineaud et al. 2003)
<i>clpP*</i>	exponentielle	+	+	-	/	(Beltramo et al. 2004a; Desroche et al. 2005; Beltramo et al. 2006)
<i>clpL1*</i>	stationnaire	+	+	+	/	(Beltramo et al. 2004a; Desroche et al. 2005; Beltramo et al. 2006)
<i>omrA</i>	ND	+	-	ND	+(NaCl)	(Bourdineaud et al. 2004)
<i>groES*</i>	-	+	ND	-	/	(Desroche et al. 2005)
<i>grpE*</i>	-	+	ND	-	/	(Desroche et al. 2005)
<i>ctsR*</i>	-	+	ND	-	/	(Desroche et al. 2005)
<i>clpL2*</i>	stationnaire	+	ND	+	/	(Desroche et al. 2005; Beltramo et al. 2006)

ND : non déterminé ; * : gènes appartenant au régulon CtsR

II. Bactéries et stress environnementaux : cas des bactéries firmicutes

II.1. La réponse aux stress des microorganismes

De manière générale, toutes les modifications de conditions environnementales pouvant être assimilées à un stress ont pour conséquence majeure l'inactivation ou l'inhibition des enzymes du métabolisme cellulaire pouvant parfois aboutir à la dénaturation des protéines cellulaires et à la formation d'agrégats protéiques délétères pour la bactérie. Afin de faire face à ces changements néfastes, la cellule tente de restaurer un métabolisme favorable à sa survie en modifiant la régulation de l'expression de ses gènes. Ce phénomène appelé **réponse au stress**, consiste en la mise en place d'un métabolisme spécifique à chaque stress avec pour conséquence l'induction de la synthèse de protéines spécifiques nommées par abus de langage « protéines de stress ». Ces protéines assurent la réparation des dommages causés par le stress. La réponse au stress est un phénomène universel rencontré aussi bien chez les bactéries que chez les organismes eucaryotes et nécessaire à leur adaptation de l'organisme à son environnement.

Deux degrés de stress peuvent être distingués : le stress bref généralement assimilé à un **choc** et le **stress** prolongé. Dans les deux cas, une adaptation de la bactérie est nécessaire et peut être décomposée de façon schématique en trois phases de réponse au stress : (i) une **phase d'alarme** qui provoque la mise en place de mécanismes de défense transitoires utilisant les constituants cellulaires préexistants ; (ii) une **phase d'adaptation** et de résistance qui induit la synthèse *de novo* de protéines nécessaires à la réparation des dommages causés par le stress ; (iii) une **phase de déclin** ou d'épuisement qui aboutit à la mort cellulaire dans le cas d'un stress intense. Dans cette dernière phase, une **adaptation de la cellule aux nouvelles conditions** par réorientation de son métabolisme est également possible. Les cellules soumises à un stress sub-létal sont capables d'acquérir de façon transitoire une tolérance qui leur permet de résister à des stress habituellement létaux. Ces phénomènes **d'acquisition de tolérance** et de **résistance croisée** sont courants et particulièrement étudiés chez *O. oeni*. Ainsi, des cellules de *O. oeni* pré-adaptées par un traitement préalable à la température sub-létale de 42°C présentent un meilleur taux de survie lors d'un ensemencement direct dans le vin que les cellules non adaptées. L'induction de la synthèse de protéines de stress permet à *O. oeni* d'acquérir une tolérance temporaire au stress (Guzzo et al. 1994). Il est également possible d'améliorer la tolérance aux sulfites en adaptant *O. oeni* à l'acidité (Guzzo et al. 1998). Plus récemment, Chu-ky et al. ont montré que les cellules

ayant subi un choc froid préalable sont capables de résister à l'effet délétère de la combinaison d'un choc acide à un choc éthanol. De même, la combinaison d'un choc froid et d'un choc éthanol contrebalance les effets délétères d'un choc éthanol (Chu-Ky et al. 2005).

Initialement mises en évidence chez la drosophile suite à un traitement thermique (Ritossa 1962, 1996), les protéines de stress furent désignées sous le terme Heat shock proteins (Hsp) (Ritossa 1962; Ritossa 1996; Schumann 2009). Par la suite, ces protéines se sont révélées ubiquitaires et phylogénétiquement bien **conservées** : la réponse au stress est **universelle**. Outre leur implication dans la réponse à un stress thermique, elles sont produites en réponse à des stress physico-chimiques divers tels que la pression, l'augmentation de température, la présence d'éthanol, l'acidité, la pression osmotique, la présence de radicaux libres et les carences nutritionnelles.

Egalement présentes en conditions optimales de croissance, le rôle principal des protéines Hsp est d'assister le repliement des protéines et prévenir l'accumulation et l'agrégation de protéines endommagées dans la cellule. Elles agissent en fonction du degré d'altération de la protéine et assurent un **contrôle qualité des protéines cellulaires**. Ainsi elles jouent le rôle de chaperons moléculaires en aidant au repliement de la protéine en conformation active, ou assurent la dégradation par protéolyse des protéines dénaturées de manière irréversible. En conditions optimales de croissance, les taux de transcription et de traduction sont élevés. Les protéines synthétisées *de novo* se replient de manière spontanée sans l'assistance des chaperons moléculaires (Figure 9 (1)). Après un choc ou stress, la transcription et la traduction ralentissent. Les protéines dénaturées s'accumulent et sont majoritairement pris en charge par les chaperons moléculaires (Figure 9 (2)). Ce phénomène s'explique principalement par la présence de protéines thermolabiles dans le cytoplasme. Les protéines altérées de manière irréversible sont dégradées par les protéases. Deux types de protéines Hsp peuvent être définies en fonction des besoins de la cellule : (i) les protéines présentes quelles que soient les conditions, cas des chaperons moléculaires universels DnaK et GroEL ; (ii) les protéines dont la synthèse est induite en cas d'altérations sévères : cas des Small Hsps (sHsps) (Narberhaus 2002).

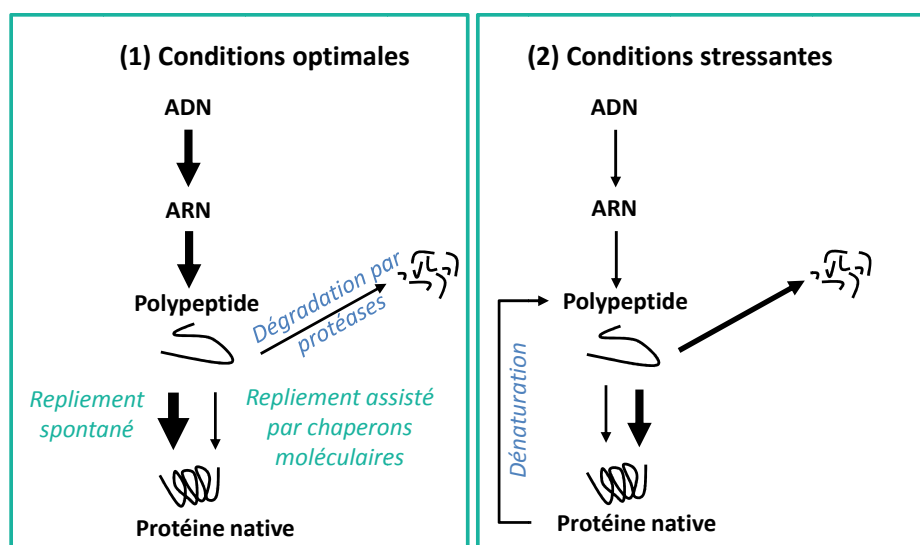


Figure 9 : Modèle simplifié du contrôle qualité des protéines cellulaires en conditions optimales (1) ou conditions stressantes (2) (Narberhaus 2002).

Les protéines de stress peuvent être classées selon différents critères : leur masse moléculaire, leur fonction ou le stress induisant leur synthèse. Dans ce chapitre, les protéines de stress seront présentées selon leur fonction. La liste ne sera pas exhaustive mais s'attardera sur les principales protéines rencontrées chez les fimicutes et plus particulièrement chez *O. oeni*.

II.2. Les chaperons moléculaires

Les chaperons moléculaires représentent une classe de protéines Hsp ayant comme rôle principal d'assurer le repliement sous conformation active des protéines synthétisées *de novo* en conditions optimales de croissance. Ce sont des marqueurs moléculaires révélateurs du stress général de la bactérie classés et désignés selon leurs masses moléculaires : Hsp100 (Clp-ATPases), Hsp90 (HtpG), Hsp70 (DnaK), Hsp60 (GroEL), Hsp40 (DnaJ, CbpA) et les Small Hsp (sHsp). Ils agissent sous forme homo- ou hétéro-oligomériques et ont parfois une activité ATPasique apportant l'énergie nécessaire à la réaction (Castanié-Cornet et al. 2014).

Ils sont définis par Narberhaus comme « une famille de protéines cellulaires responsable du repliement correct des autres polypeptides et dans certains cas de leur assemblage en structure oligomérique, mais ne fait pas partie intégrante de la structure fonctionnelle finale » (Narberhaus 2002). Lors d'un stress, les chaperons moléculaires sont mobilisés pour assurer le repliement des protéines dont la conformation a été altérée. Ils sont impliqués dans de multiples fonctions cellulaires telles que le repliement de protéines nouvellement synthétisées, le repliement des

protéines dénaturées par un stress, l'assemblage oligomérique, le transport intracellulaire de protéines et l'aide à la dégradation protéolytique (Hartl and Hayer-Hartl 2009). Ils interagissent avec leur cible de façon transitoire en reconnaissant les régions hydrophobes anormalement exposées en surface de la protéine dénaturée.

II.2.1. Les chaperons moléculaires universels : DnaK et GroEL

Les complexes DnaKJ-GrpE et GroESL sont ubiquitaires et conservés chez les bactéries et les eucaryotes. Ils sont les représentants majeurs de la famille des chaperons moléculaires et les plus abondants. Ils reconnaissent les surfaces hydrophobes des polypeptides dénaturés mais empruntent des voies différentes pour l'aide au repliement (Mendoza et al. 1991). Le recouvrement des régions hydrophobes limite l'agrégation protéique et empêchent le repliement anormal de la séquence peptidique.

II.2.1.1. DnaK-DnaJ-GrpE

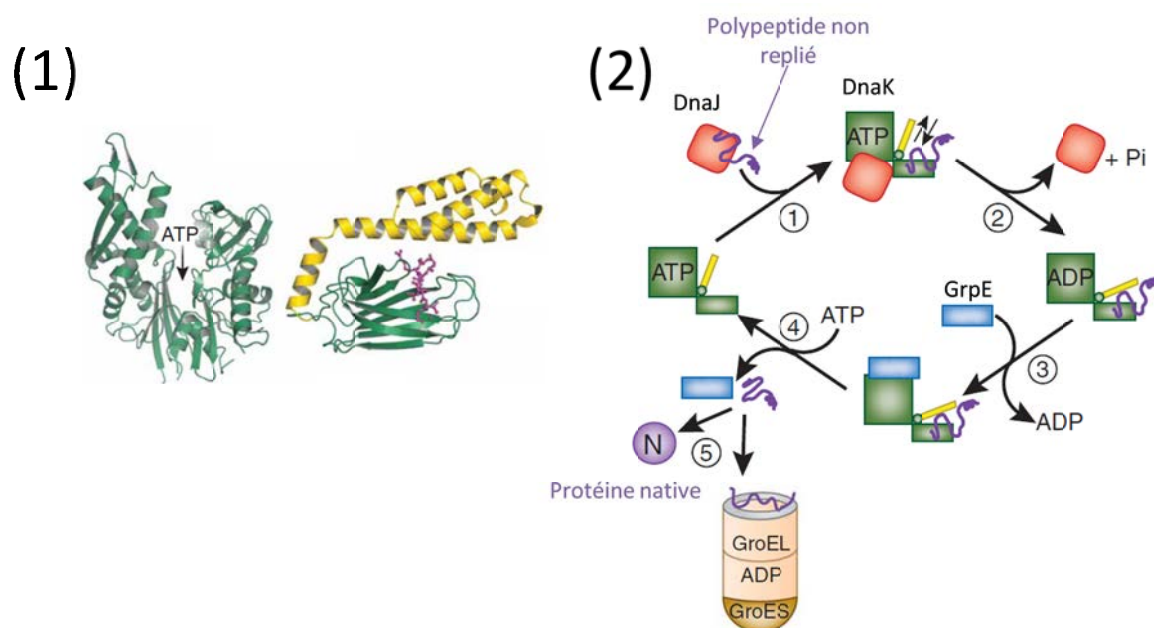


Figure 10 : Le complexe DnaKJ-GrpE. (1) Structure en trois dimensions du complexe DnaK : le domaine ATPasique et le domaine de fixation du polypeptide (Peptide-Binding Domain = PBD) apparaissent en vert. L'hélice α recouvrant le PBD est en jaune et le polypeptide-substrat en violet. La flèche ATP indique le domaine de fixation de l'ATP (Nucleotide Binding Site = NBS). (2) Mode d'action de DnaK (Hartl and Hayer-Hartl 2009).

DnaK agit une protéine chaperone ATP-dépendante qui agit de manière concertée avec deux co-chaperons : DnaJ (Hsp40) et GrpE. La protéine DnaK a la particularité d'agir en monomère. Le mode d'action de DnaK élucidé et largement étudié est présenté Figure 10. DnaK est une protéine

de 638 acides aminés présentant à l'extrémité amino-terminale un domaine de fixation de nucléotide (NBD) et à l'extrémité carboxy-terminale un domaine de fixation du substrat (*Substrat Binding Domain* = SBD) divisé en un feuillet β et une hélice α formant un couvercle (Figure 10(1)) (Castanié-Cornet et al. 2014).

Le co-chaperon DnaJ fixe le substrat et le présente à DnaK ①. L'hydrolyse de l'ATP en ADP catalysée par l'amarrage de DnaJ et provoque un changement structural du domaine NBD de DnaK aboutissant à la fermeture de l'hélice α (en jaune). Le substrat est piégé dans la cavité de DnaK et DnaJ se dissocie du complexe ②. GrpE joue le rôle d'échangeur de nucléotide et catalyse l'hydrolyse de l'ATP en l'ADP ce qui provoque un changement de conformation de DnaK. L'ouverture de l'hélice α et la diminution de l'affinité de DnaK pour son substrat provoque le décrochement de GrpE concomitant à la libération de la protéine qui peut alors se replier spontanément ③ & ④. En cas d'échec le substrat peut être pris en charge par le chaperon GroEL ou subir à nouveau un cycle de repliement par DnaK ⑤ (Hartl and Hayer-Hartl 2009). Le bilan énergétique établi par Sharma et al. (2010) a montré que cinq molécules d'ATP sont nécessaires à DnaK pour catalyser le repliement d'une molécule de luciférine dénaturée

II.2.1.2. GroEL-GroES

GroEL est un imposant complexe protéique en forme de tonneau composé de deux anneaux heptamériques de 57 kDa empilés dos à dos coopérant avec le co-chaperon GroES formant également un anneau heptamérique (Xu and Sigler 1998; Saibil et al. 2013). Chaque sous-unité oligomérique est divisée en trois domaines : (i) domaine équatorial responsable des interactions intra- et inter-domaines et de la fixation de l'ATP ; (ii) le domaine apical impliqué dans la reconnaissance et la fixation de GroES et du substrat ; (iii) le domaine intermédiaire servant de messenger relayant les changements de conformations entre les deux autres domaines (Figure 11).

Le fonctionnement du complexe GroEL-GroES a fait l'objet de nombreuses études ayant abouti à la proposition d'un mécanisme d'action modèle présenté Figure 11 (Hartl 1996; Bukau and Horwich 1998; Ranson et al. 2006; Elad et al. 2007; Castanié-Cornet et al. 2014). Les acides aminés hydrophobes exposés au niveau du domaine apical interrégissent par affinité les régions hydrophobes anormalement exposé du peptide non replié ① (Ranson et al. 2006). Au sein du complexe, les régions hydrophobes du peptide subissent une élongation tandis que les régions instables sont compactées *via* un mouvement ATP dépendant du domaine apical de GroEL ②. La

compaction du peptide est complétée par l'encapsulation par GroES (3). La fixation de GroES sur GroEL forme ainsi une cavité protectrice empêchant la fuite du substrat et permettant son repliement (4). Le peptide sous conformation native est libéré après dissociation du complexe et libération de l'ADP (5). Le repliement d'un peptide peut nécessiter plusieurs cycles répétés de repliement dans la cavité (6). Un cycle nécessite la consommation de sept molécules d'ATP. La taille de la cavité limite la taille des peptides pouvant être pris en charge à 20-60 kDa (Bukau and Horwich 1998; Hartl and Hayer-Hartl 2009).

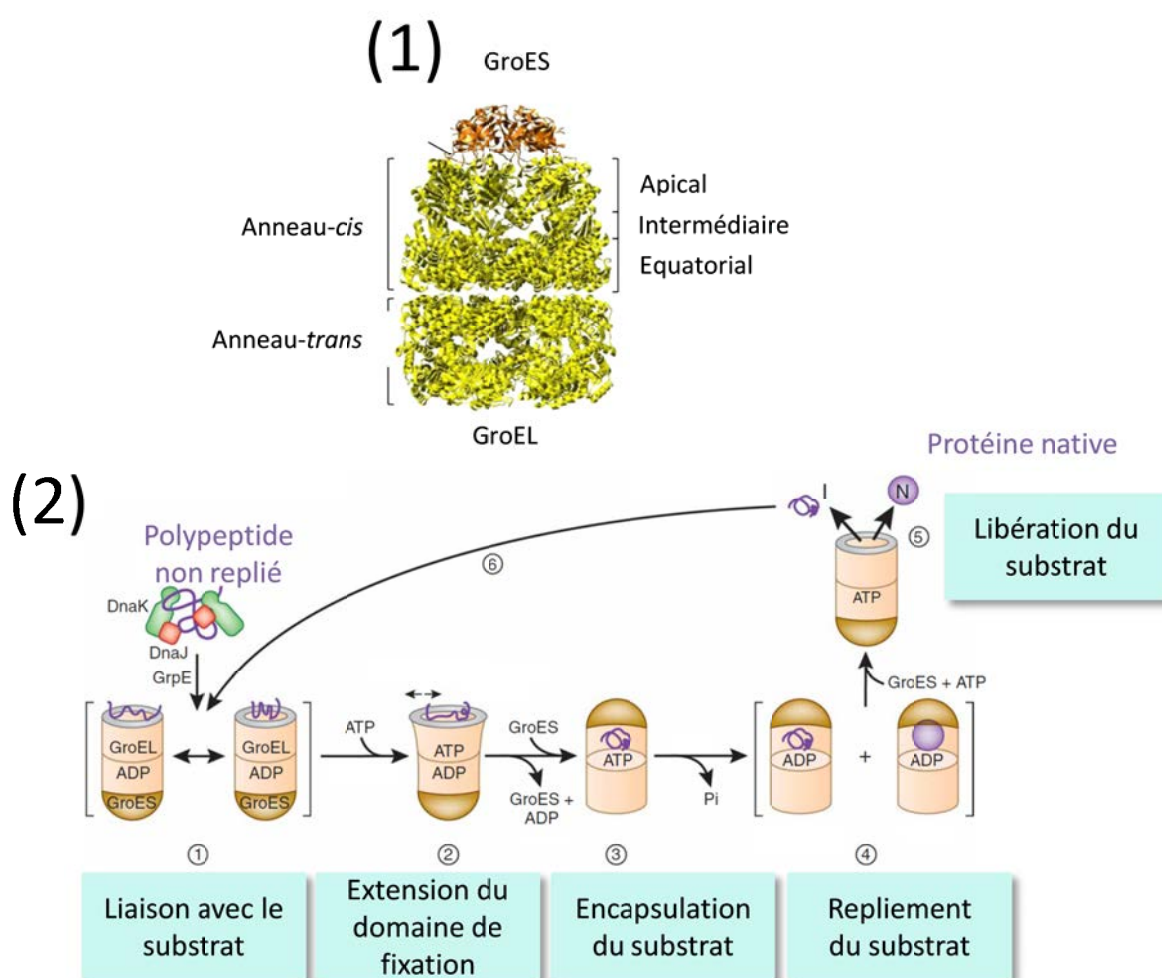


Figure 11 : Le complexe GroEL-GroES. (1) Structure en trois dimensions du complexe GroEL-GroES (Castanié-Cornet et al. 2014) et (2) Cycle de repliement d'un polypeptide par le chaperon moléculaire universel GroEL-GroES (Hartl and Hayer-Hartl 2009).

Les différences de conformation entre DnaK et GroEL reflètent les différences de **spécificités de substrats**. En effet, DnaK prend en charge les courts segments hydrophobes des protéines non natives tandis que GroEL agit en enfermant le substrat protéique complet dans une cavité hydrophobe limitant par la taille la fixation du peptide-substrat. L'action locale de DnaK lui permet de prendre en charge de plus grandes protéines. L'étude de l'interactome de DnaK par Calloni et al. a tout de même montré que DnaK interagit avec 40% des protéines prises en charge par GroEL suggérant une action concertée avec GroEL. (Calloni et al. 2012).

II.2.2. Les small Hsp

II.2.2.1. Structure

Les **small Heat Shock Proteins** (α -Hsp, SmHSP ou sHSP) ou protéines de stress de faible poids moléculaires sont des protéines ubiquitaires retrouvées chez les plantes, les animaux, les archaeobactéries et les bactéries. Contrairement aux autres chaperons moléculaires, les sHsp montrent de grandes variations de séquence, de structure et de taille. Elles présentent cependant des caractéristiques communes : (i) la présence d'un domaine **α -cristallin** d'environ 80 à 100 acides situé dans la région amino-proximale, (ii) une taille monomérique de **12 à 43 kDa**, (iii) la capacité à s'organiser spontanément en structures **oligomériques** et (iv) une activité de **chaperon moléculaire ATP-indépendant** influencée par le dynamisme de la structure oligomérique (Narberhaus 2002; Zhang et al. 2005).

La séquence peptidique des sHsp peut être divisée en trois régions distinctes :

- une **région amino-terminale variable** pouvant aller de 20 à 250 acides aminés. Très peu conservée, la région comporte tout de même deux segments de type hélice α impliqués dans l'oligomérisation de la protéine et pouvant établir des interactions hydrophobes avec le domaine α -cristallin.
- d'un **domaine α -cristallin amino-proximal** conservé constitué de sept feuillets β et une hélice α et d'un motif conservé [GVLT/VTL/V] impliqués dans la dimérisation des sHsp.
- une **courte extrémité carboxy-terminale** de taille inférieure à vingt acides aminés en majorité polaires et chargés tels que le glutamate, la lysine ou l'isoleucine. Cette région extrêmement variable et flexible possède un motif tri-peptidique conservé au sein des

espèces [I/L-X-I/L]. Comme la région amino-terminale, elle est impliquée dans la dimérisation des sHsp *via* des interactions hydrophobes (Basha et al. 2012).

II.2.2.2. Fonctions cellulaires des sHsp

Les sHsp se sont révélées être capables de prendre en charge deux substrats de nature différente : les **protéines cellulaires** et les **lipides membranaires**.

Mise en évidence dans les années 1990, l'activité chaperon des sHsp est **ATP-indépendante** et a été détectée chez de nombreuses représentantes de la famille (Horwitz 1992). Elles sont capables de reconnaître et d'interagir de façon stable avec les protéines en cours de dénaturation afin de les séquestrer et d'empêcher leur agrégation (Narberhaus 2002; Sun and MacRae 2005; Nakamoto and Vigh 2007; Basha et al. 2012). Le complexe protéique stabilisé par les sHsp est transféré à un chaperon moléculaire ATP-dépendant (DnaK, ClpB) pour leur repliement (Nakamoto and Vigh 2007). Le processus de fixation des sHsp sur leurs substrats protéiques n'est pas encore été élucidé. Les interactions sont de natures hydrophobes, hydrogènes et ioniques et comme la plupart des chaperons moléculaires, les sHsp se fixent sur les structures hydrophobes anormalement exposées à la surface des protéines dénaturées.

En absence de stress, les sHsp sont présentes sous formes oligomériques inactives, incapable de fixer les protéines immatures. La déstabilisation de ces oligomères induite par une augmentation de température, des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, acétylation) ou la présence de protéines dénaturées aboutit à un changement de conformation nécessaire à l'activation des sHsp. En effet, ce changement conformationnel conduit à l'exposition des sites hydrophobes de fixation au substrat à la surface de la structure oligomérique. Il permet soit un réarrangement des sous-unités de l'oligomère, une modification de la taille de l'oligomère ou un changement de conformation des oligomères (Figure 12). Dans tous les cas, cette modification de conformation aboutit à une augmentation d'hydrophobicité de surface indispensable à la fixation des substrats protéiques dénaturés et permet une réassociation du complexe oligomérique autour du substrat protéique (Sun and MacRae 2005; Sugimoto et al. 2008).

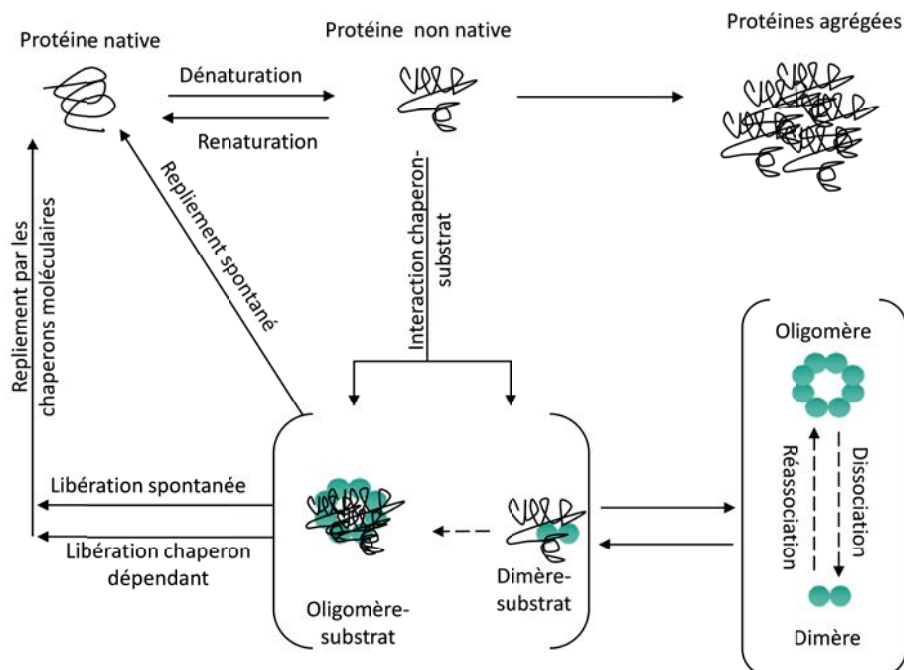


Figure 12 : Mécanisme d'oligomérisation et d'activité chaperon des sHsps (Sun and MacRae 2005)

Bien que les protéines constituent les substrats majeurs des sHsp, il est récemment apparu que certaines sHsp pouvaient interagir avec les lipides membranaires. Ainsi, les sHsp de *E. coli*, IbpA et IbpB sont préférentiellement localisées au niveau de la membrane externe lors d'un stress thermique létal et protègent les cellules lors de stress thermique et oxydatif (Nakamoto and Vigh 2007). De même, chez la bactérie photosynthétique *Synechocystis* PCC 6803, l'expression du gène *hsp17* est finement régulée par des changements d'ordre physique dans la membrane, les protéines Hsp17 nouvellement synthétisées s'associant de préférence aux membranes des thylacoïdes. La délétion du gène *hsp17* aboutit une diminution importante de l'activité photosynthétique de la bactérie lors d'un stress thermique.

L'interaction des sHsp avec les membranes est donc transitoire et spécifique. Les sHsp sont souvent qualifiées d' « agents stabilisant des membranes » et possèdent la capacité de contrôler la fluidité et de maintenir l'intégrité membranaire lors de stress (Nakamoto and Vigh 2007). Török et al. proposent le terme « **amphitrophique** » pour définir la sHsp Hsp17 car selon sa localisation cellulaire (membranaire ou cytoplasmique), elle est capable de contrôler la fluidité membranaire en s'associant de façon transitoire et spécifique aux lipides membranaires et d'empêcher la formation d'agrégats protéiques en reconnaissant spécifiquement les protéines dénaturées

cytoplasmiques (Török et al. 1997; Török et al. 2001). A l'instar de GroEL qui conserve son activité de chaperon lorsqu'il est lié à la membrane, les sHsp sont souvent et de façon abusive qualifiées de « lipochaperons ». Néanmoins, cette activité n'a, à ce jour, jamais été démontrée chez les sHsp. Par extension, ce terme désigne maintenant les protéines capables de s'associer à la membrane afin de la stabiliser.

II.2.2.3. Cas de Lo18, unique sHsp de *O. oeni*

Chez les firmicutes, plusieurs sHsp ont été identifiées : **Lo18** chez *O. oeni* (Jobin et al. 1997; Guzzo et al. 1997), Hsp18,5, Hsp18,5 et Hsp19,3 chez *L. plantarum* WCFSI (Spano et al. 2004a; Spano et al. 2005a; Capozzi et al. 2011b), Hsp16,4 chez *S. thermophilus* (Somkuti et al. 1998), Hsp20 chez *B. brevis* (Ventura et al. 2007), Hsp16 chez *L. acidophilus* (Capozzi et al. 2011a), Hsp18 chez *Clostridium acetobutylicum* (Sauer and Dürre 1993), IbpA (P17) chez *Acholeplasma laidlawii* (Vishnyakov et al. 2011). Toutes voient leur synthèse induite lors de multiples stress (thermique, osmotique, alcoolique, nutritionnel), elles jouent un rôle dans l'adaptation et la résistance de la bactérie en conditions de stress (Sugimoto et al. 2008).

La protéine Lo18 de *O. oeni* a été particulièrement caractérisée. A l'instar de Hsp16 chez *L. acidophilus* ou de Hsp18 chez *C. acetobutylicum*, elle est l'unique représentante de la famille des sHsp identifiée dans le génome de *O. oeni* (Sauer and Dürre 1993; Altermann et al. 2005; Capozzi et al. 2011a). Codée par le gène *hsp18* (0,6 kpb), Lo18 est une protéine de 148 acides aminés et présente un poids moléculaire de 16,94 kDa. Le fractionnement cellulaire associé à la technique d'immuno-histochimie a permis de mettre en évidence sa localisation membranaire en conditions de stress thermique, éthanolique ou l'ajout de benzyl alcool, un fluidifiant membranaire (Figure 13) (Jobin et al. 1997; Coucheney et al. 2005b).

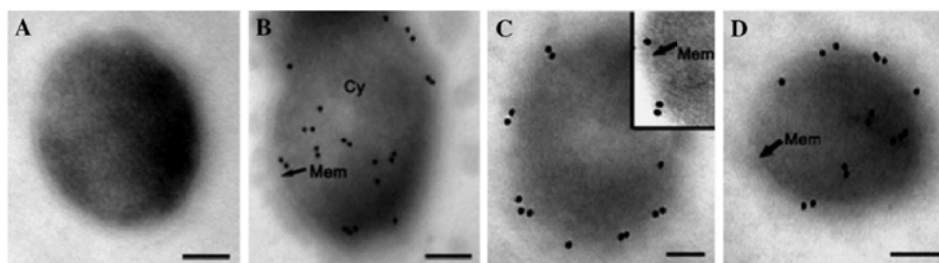


Figure 13 : Immuno-localisation par observation microscopique de Lo18 chez *O. oeni*. Utilisation d'anticorps primaires polyclonaux dirigés contre Lo18 et d'anticorps secondaires couplés à des particules d'or : (A) *O. oeni* en phase exponentielle de croissance à 30°C ; (B) *O. oeni* après choc thermique à 42°C : apparition de Lo18 dispersées dans le cytoplasme ; (C) *O. oeni* après un choc thermique à 46°C : association membranaire des protéines Lo18 et (D) *O. oeni* après ajout d'éthanol (11%) : association membranaire des protéines de Lo18 (Coucheney et al. 2005).

Chez *O. oeni*, l'expression de *hsp18* est induite par des stress variés tels que l'augmentation de température, la présence d'éthanol, l'abaissement du pH ou l'ajout de benzyl alcool, un fluidifiant membranaire (Guzzo et al. 1994; Coucheney et al. 2005b; Maitre et al. 2014). La protéine est retrouvée en grande quantité en conditions de stress (Guzzo et al. 1994; Guzzo et al. 1997; Guzzo et al. 1998; Guzzo et al. 2000), notamment lors d'un stress éthanolique (Guzzo et al. 1997; Coucheney et al. 2005b). Les possibles rôles de lipochaperon et de chaperon moléculaire de Lo18 ont largement été étudiés au laboratoire soit *in vitro* (Maitre et al. 2012; Maitre et al. 2014), soit par l'intermédiaire de systèmes d'expression hétérologue (Morel et al. 2001; Delmas et al. 2001; Weidmann et al. 2010; Ronez et al. 2012). *In vitro*, la protéine Lo18 purifiée forme un complexe oligomérique de 16-mer constitué de deux anneaux octamériques superposés (Figure 14). La protéine est capable de stabiliser la fluidité de liposomes en présence ou non d'éthanol (Delmas et al. 2001; Coucheney et al. 2005b; Maitre et al. 2012) et d'empêcher l'agrégation de la citrate synthase et de la lactate déshydrogénase en conditions dénaturantes (Delmas et al. 2001; Maitre et al. 2012). Exprimée en système hétérologue chez *E. coli*, Lo18 augmente l'acidotolérance de la bactérie et permet une meilleure solubilisation des protéines co-exprimées (Morel et al. 2001; Ronez et al. 2012).

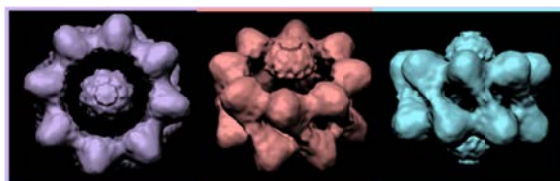


Figure 14 : Structure en trois dimensions de Lo18 observée en microscopie électronique (Résolution de 30 Å) : vue de haut en bas (panneau de gauche), Vue de haut inclinée (panneau central) et vue de côté (panneau de droite) (Maitre et al. 2012)

Les travaux de Maitre et al. ont récemment démontré qu'il existe, *in vitro*, une relation entre l'oligomérisation dynamique de Lo18 et son rôle dans la stabilisation des membranes et la protection des protéines. L'association à la membrane nécessiterait la dissociation de l'oligomère de Lo18 car la protéine s'associe à la membrane préférentiellement sous forme de dimère tandis qu'elle est retrouvée sous forme oligomérisée dans le cytoplasme (Figure 15). Dans le modèle d'oligomérisation dynamique de Lo18 en présence d'éthanol proposé par Maitre et al., la nature des phospholipides membranaires est présentée comme un facteur jouant un rôle clef dans l'oligomérisation de la protéine et par extension dans la balance entre les deux fonctions de Lo18 (Figure 15). Pour maintenir son intégrité, *O. oeni* produit une grande quantité de Lo18 jouant ses deux rôles de chaperon moléculaire et de lipochaperon. Les dimères sont préférentiellement

associés à la membrane tandis que les oligomères sont fixés sur les complexes protéiques dénaturés. Durant un stress éthanolique, la modification dans la composition lipidique de la membrane pourrait être responsable de la libération des dimères rendus alors disponibles pour la formation d'oligomères et la protection des protéines cytoplasmiques.

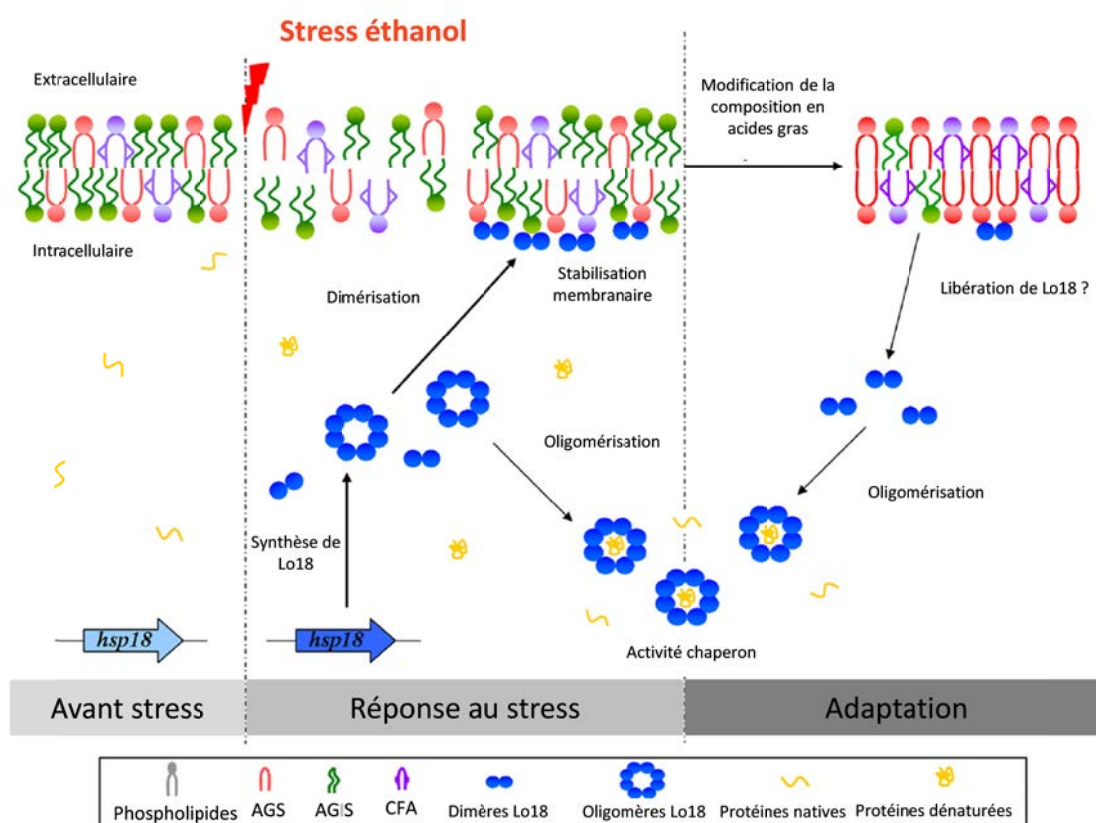


Figure 15 : Modèle de l'oligomérisation dynamique de Lo18 en présence d'éthanol (Maitre et al. 2014).

L'implication du domaine α -cristallin dans les deux fonctions des sHsp reste difficile à élucider. En effet, les travaux de Lentze et al. chez *Bradyrhizobium japonicum* avaient suggéré l'implication d'une phénylalanine fortement conservée au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de ce domaine dans l'interaction de la protéine avec ses substrats, sa substitution aboutissant à la perte de l'activité chaperon moléculaire sans altération de son oligomérisation (Lentze et al. 2003). Cependant une substitution équivalente d'un résidu tyrosine par une alanine dans la séquence peptidique de Lo18 n'a montré aucun changement d'activité chaperon et d'oligomérisation (Weidmann et al. 2010). En revanche, il semble que le résidu tyrosine en question soit requis pour l'activité lipochaperon et que l'alanine n° 123 soit indispensable à l'activité chaperon moléculaire de Lo18.

II.3. La famille des protéines Clp

II.3.1. Classification- fonction des protéines Clp

Les **Clp-ATPases** homologues aux Hsp100 des eucaryotes sont désignées avec la protéase ClpP par le terme *Caseinolytic proteins* bien que seule la protéine ClpP ait réellement une activité protéasique. Les Clp-ATPases sont les protéines ATP-dépendantes les plus répandues chez les bactéries. Elles jouent un rôle dans le **contrôle qualité** et la **dégradation sélective** des protéines cellulaires endommagées suite à un stress thermique. Elles appartiennent à la superfamille des ATPases AAA⁺ (*ATPases Associated with a variety of cellular Activities*) caractérisée par la présence d'un ou deux domaines conservés d'environ 200-250 acides aminés (**AAA-1 ou AAA-2**) comprenant différents motifs dont les motifs Walker A et B nécessaires à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (domaine **NBD** : *Nucleotide Binding Domain*) (Confalonieri and Duguet 1995; Neuwald et al. 1999). Ainsi deux classes de Clp-ATPases peuvent être distinguées selon la présence d'un domaine NBD (AAA-2) pour la classe II ou de deux NBD (AAA-1 et AAA-2) pour la classe I. Les protéines ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, et ClpL comportent deux domaines de fixation aux nucléotides (NBD contenus dans AAA-1 et AAA-2) et appartiennent à la classe I. La protéine ClpX qui ne présente qu'un seul NBD appartient à la classe II (Figure 16).

La classe I est divisée en sous-familles selon la conservation de motifs peptidiques ou du nombre d'acides aminés séparant les deux domaines AAA. La présence de la signature tri-peptidique [LIV]-G-[FL], principalement **[V-G-E]** chez les firmicutes, en aval du domaine AAA-2 à la surface d'une boucle permet aux Clp-ATPases de s'associer à la peptidase ClpP. Ce tri-peptide est présent dans la séquence de ClpA, ClpC et ClpE mais pas ClpB et ClpL (Kim et al. 2001). Cette association ClpP-Clp-ATPase forme un complexe protéolytique qui dégrade les protéines dénaturées et endommagées (Kress et al. 2009; Alexopoulos et al. 2012). Au sein de ce complexe, les Clp-ATPases sont responsables de la reconnaissance, du dépliement et de la translocation du substrat dans la cavité de dégradation de ClpP. En effet, les protéines destinées à la protéolyse par ClpP sont préalablement remodelées par les Clp-ATPases puis transférées dans l'anneau protéolytique formé par l'ATPase et la protéase (Figure 17(1)). Un domaine de 35 acides aminés présentant des similarités avec les protéines **UvrB** et **UvrC** impliquées dans les processus d'excision et de réparation des nucléotides de l'ADN endommagé est présent chez ClpC et ClpE (Ingmer et al. 1999). Chez ClpX, le motif en doigts de zinc semble avoir un rôle

dans la dimérisation tandis que pour la protéine ClpE de *L. lactis*, il serait impliqué dans l'interaction avec le régulateur CtsR (Varmanen et al. 2003; Wojtyra et al. 2003).

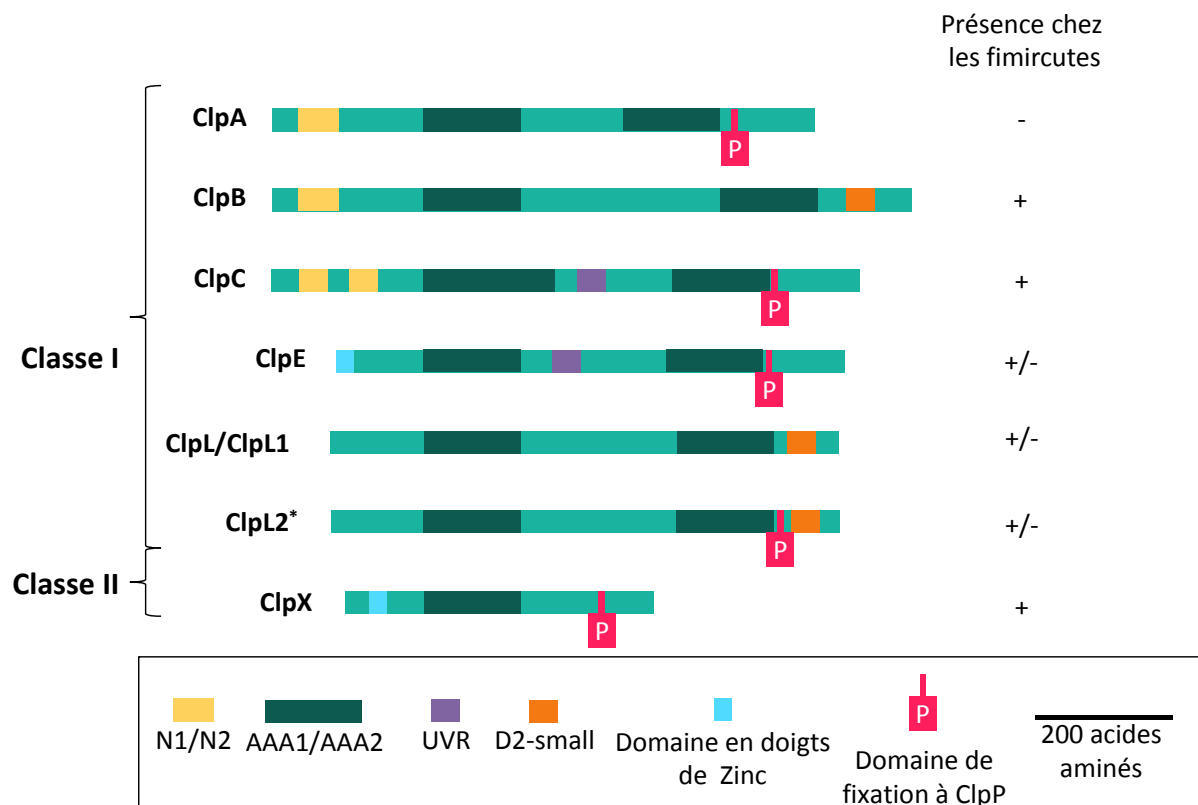


Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation structurale des sous familles de Clp-ATPases (Frees et al. 2007).

* : Présence de la protéine ClpL2 uniquement chez les *Leuconostocaceae*. Les protéines ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, et ClpL comportent deux domaines de fixation aux nucléotides (NBD contenus dans AAA-1 et AAA-2) contrairement à ClpX qui n'en comporte qu'un seul. Les différents domaines à l'origine de la classification des Clp-ATPases sont représentés : les domaines N1 et N2 sont impliqués dans la fixation des protéines, le domaine P est impliqué dans l'interaction avec la protéine ClpP et le domaine Zn contient un motif en doigts de zinc qui aurait un rôle dans la fixation de CtsR (Varmanen et al. 2003).

En absence de la sous-unité protéolytique, les Clp-ATPases s'assemblent en structures oligomériques et agissent comme de véritables chaperons moléculaires libérant la protéine-substrat en conformation native (Zolkiewski 2006). La structure oligomérique des Clp-ATPases est formée de deux anneaux hexamériques superposées formant une chambre (Figure 17(2)). La protéine dénaturée est captée au niveau de ses régions hydrophobes anormalement exposées puis entre par le pore formé par les deux sous-unités hexamériques. L'hydrolyse de l'ATP permet un changement conformationnel de l'oligomère et l'entrée du substrat dans la cavité. La protéine native est expulsée après un processus de repliement ATP-dépendant (Figure 17 (2)).

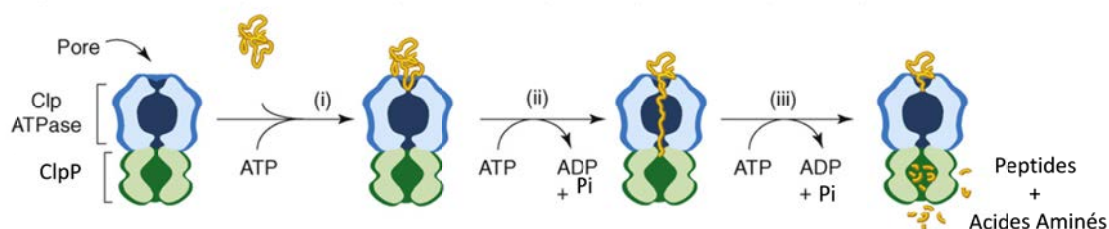
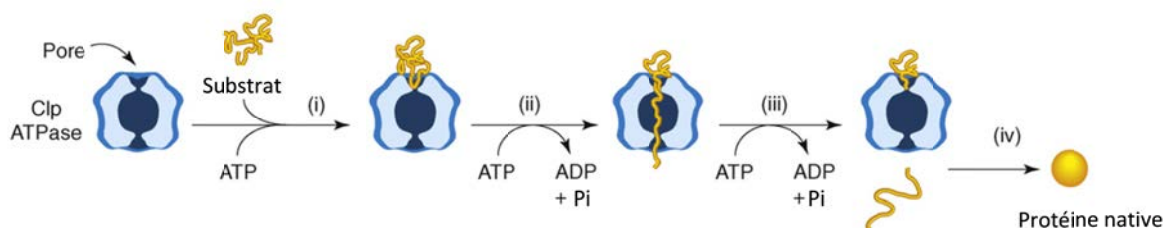
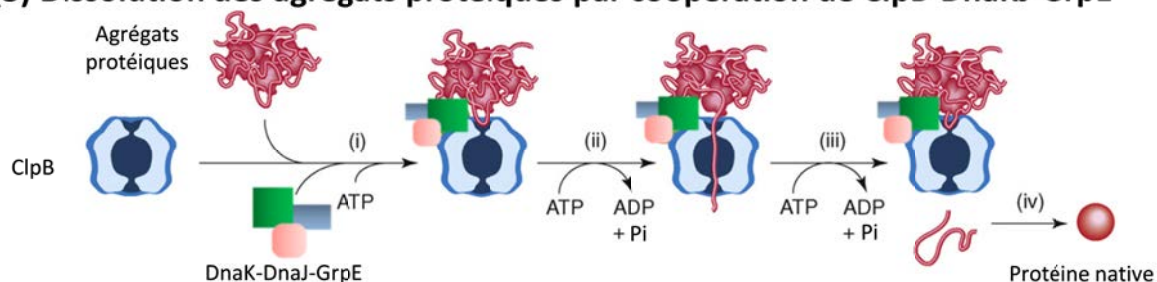
(1) Dégradation des protéines par le complexe protéasique (Clp-ATPase-ClpP)**(2) Repliement des protéines par les Clp-ATPases****(3) Dissolution des agrégats protéiques par coopération de ClpB-DnaKJ-GrpE**

Figure 17 : Différents mécanismes d'action des Clp-ATPases (Doyle and Wickner 2009).

Au-delà des rôles classiques de contrôle qualité des protéines, de nombreux **rôles pléiotropiques** des Clp-ATPases ont été décrits chez les firmicutes. Ainsi, les Clp-ATPases sont impliqués dans des processus cellulaires tels que la **tolérance au stress**, la **virulence**, la **compétence**, la **formation de biofilm**, la **dégradation spécifique de régulateurs** (Frees et al. 2003; Chastanet et al. 2004; Frees et al. 2014).

II.3.2. Cas particulier de ClpB

La protéine **ClpB** se distingue des autres Clp-ATPases par des singularités structurales et fonctionnelles. ClpB peut s'organiser en deux anneaux hexamériques superposés typique des Clp-ATPases mais aussi former des anneaux heptamériques (Kim et al. 2000; Hoskins et al. 2009). Incapable de se fixer à ClpP ni à aucunes autres peptidases, ClpB possède la capacité unique de désagréger les protéines sans intervenir dans la dégradation de substrats protéiques. L'expression du gène *clpB* constitue, elle aussi, une originalité car elle aboutit à la synthèse de

deux polypeptides de tailles différentes principalement due à la présence d'un site interne d'initiation de la traduction. Cette particularité est conservée chez de nombreuses bactéries, *E. coli*, *Synechococcus* sp, *streptomyces albus*, *L. lactis* (Squires et al. 1991; Eriksson and Clarke 1996; Grandvalet et al. 1999; Ingmer et al. 1999) mais pas chez *Mycoplasma pneumoniae* (Kannan et al. 2008).

ClpB agit en concertation avec le complexe DnaKJ-GrpE dont le mécanisme d'action a été décrit dans le chapitre II.2.1.1. ClpB n'intervient pas dans la dégradation des substrats protéiques mais se fixe directement sur les agrégats protéiques afin de les dissoudre puis les présente au complexe protéique DnaKJ-GrpE pour repliement. Les changements structuraux de ClpB provoqué par l'hydrolyse de l'ATP permettent le cisaillement et le déroulement des protéines agrégées (Figure 17(3)). Initialement décrit chez *E. coli*, le rôle de ClpB dans la solubilisation des protéines agrégées en coopération avec DnaK est également conservé chez les firmicutes (Mogk et al. 1999; Frees et al. 2007). Le mécanisme de cette coopération n'est pas totalement élucidé. Cependant, il semble que DnaK contrôle l'activité de ClpB via une interaction entre une boucle distale du domaine M (*Middle domain*) situé entre les deux sites AAA-1 et AAA-2 de ClpB et le NBD-2 de DnaK (Lee et al. 2003; Sielaff and Tsai 2010; Lee et al. 2013; DeSantis et al. 2014). DnaK et les substrats protéiques peuvent alors agir sur l'assemblage et le désassemblage de la structure oligomérique de ClpB en régulant son activité ATPasique (Aguado et al. 2015). Récemment, la technique de double-hybride bactérien a permis à Doyle et al. de montrer une compétition entre ClpB et GrpE pour la fixation sur les NBD de DnaK (Doyle et al. 2015). La région amino-terminale de ClpB est impliquée dans l'interaction avec les protéines-substrats tandis que sa région carboxy-terminale joue un rôle dans l'oligomérisation (Barnett et al. 2000). ClpB présente une forte affinité pour les substrats protéiques déstructurés de de taille supérieure à 152 acides aminés et plus particulièrement pour les polypeptides exhibant le motif SsrA [AANDENYALAA] (Li et al. 2015a). Des travaux récents ont montré que ClpB est une translocase qui catalyse la désagrégation des protéines par fixation sur les boucles exposées en une ou deux étapes de translocation suivies d'une dissociation rapide (Li et al. 2015b).

Si de nombreuses données sont disponibles sur le rôle de la protéine ClpB chez les bactéries à Gram négatif, il n'en est pas de même chez les firmicutes et les bactéries lactiques. Chez les Gram négatifs, ClpB est impliquée dans la résistance hyper ou hypo-thermique et dans la

virulence, dans la résistance au stress oxydatif et la croissance en conditions de carences nutritives (Ekaza et al. 2001; Lourdault et al. 2011; Zhang et al. 2013; Singh and Jiang 2015). Chez *Pseudomonas putida*, ClpB est essentielle à la solubilisation des agrégats protéiques et à la survie à hautes températures (Ito et al. 2014). Chez *L. monocytogenes*, le mutant *clpB* n'est pas affecté dans sa croissance en conditions de stress mais l'est dans sa capacité à infecter la souris. Outre son implication dans la virulence, ClpB est nécessaire à la thermotolérance de *L. monocytogenes* lors d'un stress thermique subléthal (Chastanet et al. 2004). Chez *S. aureus*, le gène semble nécessaire à la croissance intracellulaire, sa délétion montrant une diminution de la pathogénicité de la bactérie (Frees et al. 2004). La délétion du gène *clpB* chez *B. amyloliquefaciens* diminue la capacité de colonisation et de formation de biofilm de la bactérie (Zhao et al. 2015). Chez *L. lactis* comme pour *S. albus*, l'interruption du gène n'aboutit pas à un phénotype remarquable et ne semble pas affecter la résistance de la bactérie aux différents stress testés (thermique, osmotique, ou à la puromycine) ce qui indique un rôle mineur de ClpB pour certaines espèces (Grandvalet et al. 1999; Ingmer et al. 1999).

II.3.3. Rôles de chaperons moléculaires ClpC et ClpX

Les rôles des chaperons ClpC et ClpX sont le plus souvent associés aux complexes protéasiques ClpCP et ClpXP. Cependant, ces deux Clp-ATPases sont capables d'avoir une activité de chaperon moléculaire indépendamment de ClpP (Figure 17(2)). Bien que la présence des différents représentants de la famille des Clp-ATPases au sein d'un microorganisme varie d'un genre à un autre, ClpX et ClpC semblent ubiquitaires des bactéries à Gram positif.

La protéine ClpX est caractérisée par la présence d'un seul domaine NDB, un motif en doigts de zinc et du motif tripeptidique de fixation à la protéase ClpP (Gottesman et al. 1993; Wawrzynow et al. 1996). Chez *B. subtilis*, l'interruption du gène *clpX* affecte la croissance à haute température ou en phase stationnaire, la morphologie cellulaire, la compétence et la capacité de sporulation (Gerth et al. 1996; Msadek et al. 1998; Gerth et al. 1998). Ces résultats montrent que ClpX est requise pour la survie de la bactérie en conditions de stress. Chez *S. aureus*, la capacité du mutant *ΔclpX* à infecter un modèle murin est affectée ainsi que sa capacité de survie en conditions de stress oxydatif. De façon surprenante, la croissance de ce mutant est améliorée en conditions de stress thermiques (Frees et al. 2003). Chez *S. pneumoniae*, la délétion du gène *clpX* entraîne une rapide perte de viabilité sans modification de la morphologie cellulaire (Robertson et al. 2003).

Ces études soulignent l'importance de ClpX dans les processus cellulaires mais aussi dans la réponse adaptative aux stress des bactéries firmicutes.

Initialement nommée MecB (*Medium-independent Expression of Competence*), la Clp-ATPase ClpC présente deux NBD et le motif tripeptidique conservé [VGF] de fixation à ClpP. Contrairement à la protéine ClpC de *E. coli*, ClpC de *B. subtilis* présente une faible activité ATPasique et requière la présence de protéines adaptatrices également appelées co-facteurs pour acquérir sa fonction de chaperon tels que McsA ou McsB (Kirstein et al. 2006; Kirstein et al. 2007). Chez *B. subtilis* et *S. aureus*, ClpC est vraisemblablement la partenaire privilégiée de ClpP pour la reconnaissance et dégradation des substrats protéiques dénaturés (Krüger et al. 2000; Frees et al. 2004; Kock et al. 2004). Chez *B. subtilis*, le mutant $\Delta clpC$ présente un défaut de croissance à haute température, une élongation morphologique des cellules, une expression prématurée des gènes de sporulation (Krüger et al. 1994; Msadek et al. 1994). ClpC intervient dans la régulation du répresseur négatif des gènes de classe III, CtsR, du régulateur positif ComK et du facteur de sporulation YpbH (Msadek et al. 1994; Turgay et al. 1997; Turgay et al. 1998; Derré et al. 2000; Persuh et al. 2002). Chez *S. mutans* et *S. pneumoniae*, l'importance de ClpC est limitée. Chez *S. mutans*, le mutant ne présente aucun phénotype particulier (Lemos and Burne 2002) tandis que chez *S. pneumoniae*, la protéine ClpC ne semble pas requise ni pour la compétence ni pour la thermotolérance (Chastanet et al. 2001).

Chez *B. subtilis*, ClpC et ClpX interviennent dans la régulation de l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR, au même titre que ClpE chez *L. lactis* et ClpL chez *S. mutans* (Varmanen et al. 2003; Kirstein et al. 2005; Tao and Biswas 2013a).

II.3.4. Rôles de ClpE et ClpL : Clp-ATPases spécifiques des firmicutes

A l'instar de ClpA exclusivement retrouvée chez les bactéries à Gram négatif, ClpE mise en évidence lors du projet de séquençage du génome de *B. subtilis*, est conservée et restreinte aux firmicutes (Derré et al. 1999a). De même, ClpL est exclusivement représentée chez les firmicutes (Chastanet et al. 2001). Longtemps confondues, ces deux Clp-ATPases se distinguent par la présence du motif en doigts de zinc et du motif tripeptidique [VGF] chez ClpE, deux motifs absents de la séquence de ClpL (Chastanet et al. 2001).

Chez les bactéries firmicutes pathogènes tels que *S. pneumoniae* et *L. monocytogenes*, ClpE est impliquée dans la virulence, la thermotolérance et la division cellulaire (Nair et al. 1999; Chastanet et al. 2001). Chez les bactéries lactiques et plus particulièrement chez *L. lactis*, ClpE est impliquée dans la régulation de l'activité de CtsR et participe à la dégradation des protéines cellulaires en association avec ClpP (Ingmer et al. 1999; Varmanen et al. 2003).

Absent du génome de *B. subtilis*, le gène **clpL** a été identifié chez de nombreux firmicutes. Initialement, le rôle de **ClpL** a été étudié chez les firmicutes pathogènes. Chez *S. pneumoniae*, ClpL est capable d'une part de moduler l'expression de gènes de virulence et d'autre part d'inhiber l'adhérence de la bactérie dans le tractus nasopharyngé et les poumons (Kwon et al. 2003; Tu et al. 2007; Nguyen et al. 2014). L'implication de ClpL dans la virulence et la formation de biofilm a également été mise en évidence chez *S. mutans* et *S. aureus* (Frees et al. 2004; Kajfasz et al. 2009). Concernant la famille des bactéries lactiques, ClpL est impliquée dans des processus d'acquisition de thermotolérance chez *L. reuterii*, *L. gasseri*, *S. thermophilus* et *L. rhamnosus*, (Varcamonti et al. 2006; Wall et al. 2007; Suokko et al. 2008; Simões et al. 2010). De plus, chez *L. rhamnosus*, *L. reuterii* et *L. delbuckii*, ClpL semble également impliqué dans l'acquisition de la tolérance au stress et au stress biliaire pour *L. delbuckii* (Wall et al. 2007; Simões et al. 2010; Ferreira et al. 2013).

La ressemblance des mutants *clpL* et *clpB* d'un point de vue phénotypique chez *S. aureus*, suggère que ces deux protéines ont des fonctions similaires dans l'acquisition de la thermotolérance avec un rôle prépondérant pour ClpL (Frees et al. 2004). Cette observation laisse également supposer que ClpL aurait un rôle de chaperon moléculaire en conditions de stress chez les bactéries lactiques analogue à ClpB. Comme ClpB, ClpL est dépourvu de la signature tripeptidique de fixation à ClpP [LIV]-G-[FL], de la séquence N1 caractéristique de ClpC et du motif en doigt de Zinc identifié chez ClpE et ClpX (Figure 16) (Varmanen et al. 2003; Frees et al. 2004). La région centrale séparant AAA-1 et AAA-2 présente une taille comparable à celle de la sous-famille ClpC. A l'instar de ClpB, ClpL possède dans sa partie carboxy-terminale le motif D2-small (Lee et al. 2003). Identifié dans la séquence peptide de ClpL chez *S. mutans*, ce domaine semble impliqué dans la reconnaissance et la stabilisation du régulateur CtsR. Sa délétion aboutit à la perte de l'activité chaperon de ClpL vraisemblablement due à une incapacité d'oligomérisation (Tao and Biswas 2013a). Un motif conservé de 8 acides aminés

(MDDLFNQL, positions 11-18) situé dans la région amino-terminale hydrophobe des protéines ClpL de *S. pneumoniae* et *L. lactis* a également été mis en évidence par les travaux de Kwon et al. (Kwon et al. 2003).

Bien que le rôle de chaperon moléculaire de ClpL chez de nombreux firmicutes et bactéries lactiques ne soit plus à prouver, le mécanisme d'action était jusqu'à présent inconnu. Park et al. ont récemment proposé une caractérisation biochimique *in vitro* de la protéine ClpL de *S. pneumoniae* (Park et al. 2015). ClpL possède deux caractéristiques qui la distingue des autres Clp-ATPases : (i) la présence de Mn^{2+} ou Mg^{2+} augmente l'activité nucléotide-hydrolase et l'activité chaperon ; (ii) une activité NTPase (N : nucléotide). Les deux domaines NBD sont impliqués dans l'activité chaperon, l'activité ATP-hydrolase et l'hexamérisation de la protéine. ClpL constitue l'unique représentante de la famille des Clp-ATPases ayant une activité chaperon dépendante de la présence de Mn^{2+} et indépendante de la présence d'autres co-chaperons (Park et al. 2015). Ces caractéristiques la distinguent définitivement de ClpB malgré la similitude de séquences.

II.3.5. Cas particuliers des Clp-ATPases chez *O. oeni* : Pas de ClpB ni de ClpE mais deux ClpL !

Concernant ses Clp-ATPases, *O. oeni* fait preuve d'originalité. Seuls trois gènes codant des protéines de la classe I (*clpC* et deux gènes *clpL*) et un gène codant une protéine de la classe II (*clpX*) sont présents dans le génome (Figure 16). L'absence de **ClpB** n'est pas une exception au génome de *O. oeni*. Elle a été remarquée chez de nombreuses bactéries lactiques telles *L. casei*, *L. delbrückii*, *L. reuterii*, *L.* et *S. thermophilus*. De manière surprenante pour une bactérie lactique mais cohérente pour un *Leuconostocaceae*, aucun gène codant une protéine similaire à **ClpE** n'a été identifié dans le génome de *O. oeni*.

La présence de deux gènes **clpL** est une particularité qui peut être également étendue à l'ensemble des bactéries de la famille des *Leuconostocaceae* (Figure 16). Deux gènes *clpL* ont été remarqués chez *L. rhamnosus*. Ils présentent une forte identité avec le gène *clpL* de *L. plantarum* (98,5%) et l'un d'eux aurait été acquis par transfert horizontal et est requis lors d'une culture prolongée à haute température (Suokko et al. 2005). Contrairement aux gènes *clpL* de *L. rhamnosus* et *L. lactis*, les régions encadrant les gènes *clpL* de *O. oeni* ne présentent pas de gènes

codants des transposases tronquées et ni de motifs inversés-répétés (Huang et al. 1993; Suokko et al. 2005; Grandvalet 2011).

La classification des Clp-ATPases porte principalement sur la conservation de motifs, en particuliers les domaines NBD et AAA (Figure 16) et du positionnement de ces motifs les uns par rapport aux autres. Le nombre de résidus peptidiques séparant les deux domaines NBD (AAA-1 et AAA-2) des sous-familles ClpB, ClpE et ClpL sont fortement similaires. Ces sous-familles se distinguent par une extrémité amino-terminale courte portant un domaine N1 et un domaine D2-small en carboxy-proximal pour ClpB et la présence d'un motif en doigt de zinc, du tripeptide pour la reconnaissance de ClpP et d'un domaine UVR pour ClpE. La sous-famille ClpL, quant à elle, s'apparente à une protéine ClpE dénuée de motif en doigt de zinc et du tripeptide [VGF] et portant un motif D2-small dans sa région carboxy-proximale. L'alignement des séquences peptidiques des protéines ClpL issues de différents *Leuconostocaceae* rend compte de l'existence de deux sous familles d'ATPases, nommées ClpL1 et ClpL2 (Figure 18) (Grandvalet 2011). L'arbre phylogénétique issu de cet alignement (Figure 18) souligne une grande similitude entre les sous-familles ClpE et ClpL2 et un rapprochement des ClpL1 avec la sous-famille ClpL. Les 8 résidus [MDDL FNQL] caractérisés par Kwon et al. et conservé dans la séquence des protéines ClpL de *L. lactis* et *S. pneumoniae* sont retrouvés dans la sous-famille ClpL1 mais absent de la séquence des protéines ClpL2 ce qui distingue ces deux sous-famille (Kwon et al. 2003). L'alignement des séquences peptidiques des Clp-ATPases des sous familles ClpL et ClpE issues de firmicutes contre les séquences peptidiques de ClpL des *Leuconostocaceae* permet également de mettre en évidence la présence d'un motif [VGF] dans la séquence des protéines ClpL2. La présence de ce motif rapproche phylogénétiquement les sous-familles ClpL2 et ClpE où ClpL2 constituerait une protéine ClpE dénuée de motif en doigt de zinc ayant acquis une région carboxy-proximale spécifiant la fixation de son substrat.

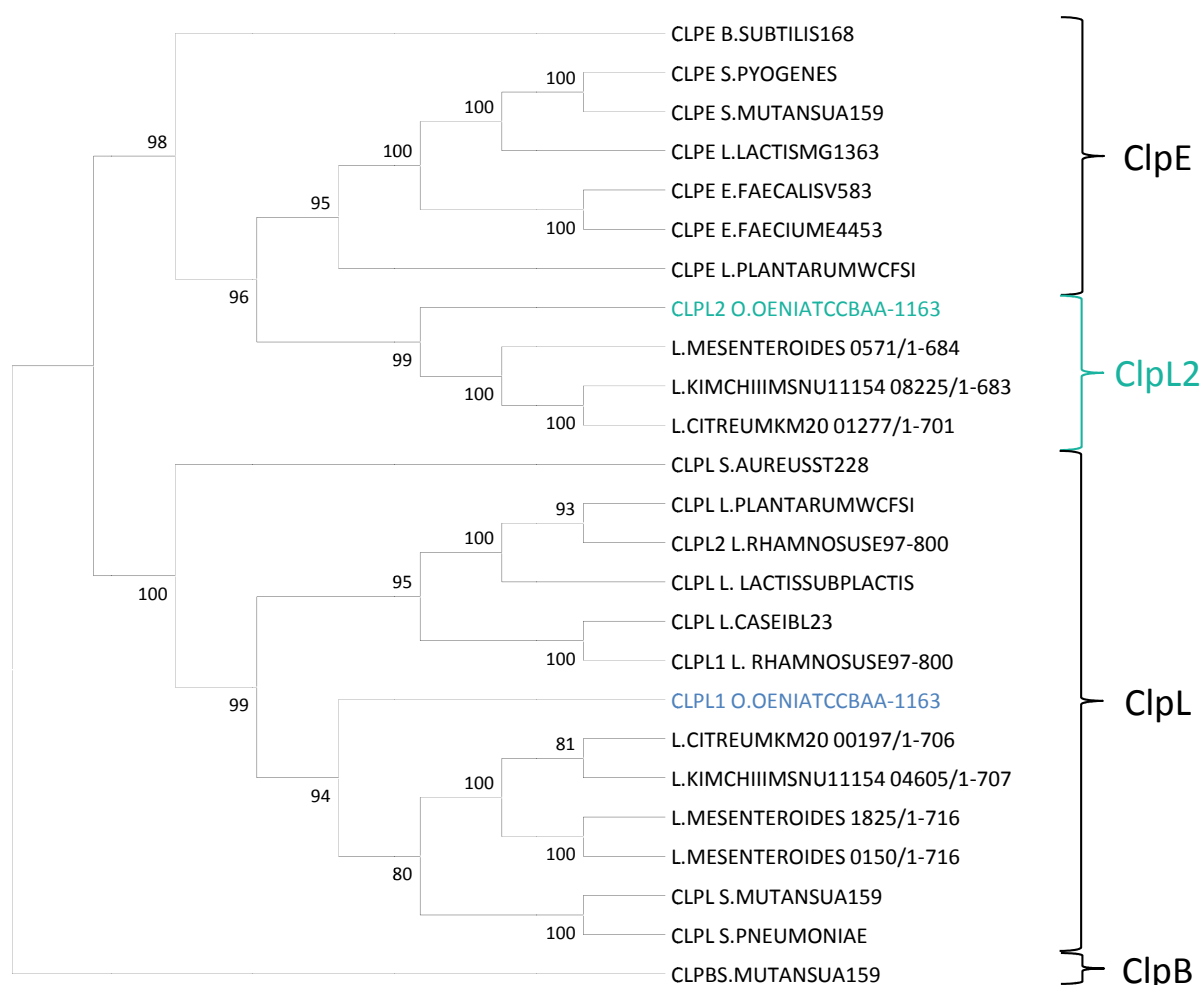


Figure 18 : Arbre phylogénétique tracé à partir de l'alignement des séquences peptidiques des Clp-ATPases de classe I identifiés dans le génome des bactéries de la famille des *Leuconostocaceae* contre les séquences peptidiques de ClpE et/ou de ClpL de *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 (AAD01782.1), *L. lactis* subsp *lactis* CNRZ270 (CAA44207.1), *L. plantarum* WCFSI (YP_004889161.1; YP_004891060.1), *S. aureus* ST228 (CCJ23596.1), *S. pneumoniae* D39 (ABJ54606.1; AFC91878.1), *B. subtilis* 168 (NP_389253.1), *S. mutans* UA159 (NP_720997.1), *S. pyogenes* A20 (AFV38356.1), *E. faecalis* V583 (NP_814457.1), *E. faecium* E980 (EFF38193.1) et *L. rhamonusus* E97-800(AAW22449.1; AJ749818), *L. casei* BL23 (CAQ67279.1). L'analyse des banques de données a révélé la présence de gènes codant des Clp-ATPases de classe I de la famille des ClpL chez *L. citreum* KM20, *L. kimchii* IMSNU 11154, *L. mesenteroides* subsp *cremoris* ATCC 19254, *L. mesenteroides* subsp *mresenteroides* ATCC 8293 et *O. oeni* ATCC BAA-1163 (CAE54288.1; EAV39924.1). Méthode des plus proches voisins utilisant le modèle de Poisson. L'arbre est construit par mesure des distances moyennes calculées à partir du % d'identité des séquences peptidiques issues de l'alignement multiple présenté en Annexe 1. L'arbre est enraciné par ajout de la séquence peptidique de ClpB de *S. mutans* UA159 (NP_721783.1).

II.4. Les protéases

Quand l'arsenal de chaperons moléculaires devient impuissant face au flot de protéines dénaturées et agrégées, la cellule déploie ses protéases afin de dégrader les protéines dénaturées de façon irréversible et assainir le cytoplasme. Ces protéases majoritairement ubiquitaires sont impliquées dans le contrôle qualité des protéines cellulaires et permettent à la cellule de maintenir

son homéostasie. Quatre classes de protéases ATP-dépendantes bactériennes ont été décrites : FtsH (HflB), Lon, HslUV (ClpQY) et ClpP. Cette dernière s'associe à une Clp-ATPase pour former un complexe protéasique ClpAP, ClpCP, ClpEP et ClpXP. Outre leur rôle en conditions de stress, ces protéines peuvent être impliquées dans le contrôle du taux et de la disponibilité dans le temps et l'espace de protéines régulatrices (Msadek et al. 1998; Liu et al. 1999; Chastanet et al. 2001; Simmons et al. 2008). L'absence de Lon et ClpQ restreint les protéases ATP-dépendantes disponibles chez les bactéries lactiques. A ce jour, les protéases impliquées dans la réponse au stress décrites chez les bactéries lactiques sont ClpP, FtsH et HtrA. Chez *L. lactis*, ces trois protéines sont indispensables à la survie de la bactérie en conditions de stress (Nilsson et al. 1994; Frees and Ingmer 1999; Foucaud-Scheunemann and Poquet 2003).

Ce paragraphe présente les principales protéases impliquées dans la réponse au stress décrites chez les firmicutes. Un bilan faisant état de l'avancement de l'étude de ces protéases chez *O. oeni*, est établi pour chaque protéase.

II.4.1. ClpP

Chez les firmicutes à faible % G-C, la protéase ClpP joue un rôle essentiel dans la dégradation des protéines altérées lors d'un stress. La mutation du gène *clpP* altère la croissance à haute température chez de nombreuses bactéries telles que *B. subtilis*, *L. lactis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* et *Streptococcus pneumoniae* (Msadek et al. 1998; Frees and Ingmer 1999; Robertson et al. 2002; Lemos and Burne 2002; Nair et al. 2003; Frees et al. 2003). La protéine ClpP est une protéase à sérine avec une structure oligomérique formée de deux anneaux de sept sous unités chacune formant une cavité enfermant le site actif (Porankiewicz et al. 1999). Pour reconnaître et dégrader spécifiquement les protéines dénaturées, le complexe multimérique formé par ClpP doit s'associer avec un ou deux anneaux hexamériques de Clp-ATPases. L'ensemble forme un complexe à activité protéasique désigné sous le terme **protéase ClpP**. L'organisation structurale du complexe protéasique ClpP porte une ressemblance avec le protéasome 26S des organismes eucaryotes (Kessel et al. 1995). ClpC est le partenaire privilégié de ClpP chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Krüger et al. 2000; Frees et al. 2004). En l'absence de ces ATPases, seuls les peptides de faibles poids moléculaires entrent dans la cavité protéasique de ClpP et sont lentement dégradés (Molière and Turgay 2009). ClpP est sensible aux antibiotiques cycliques composés

d'acyldepsipeptides (ADEPs) provoquant la dissociation du complexe Clp-ATPase-ClpP. L'ajout d'ADEPs provoque une dégradation anarchique des chaînes peptidiques émergeant des ribosomes (Kirstein et al. 2009). Chez *S. mutans*, l'inactivation de ClpP altère la croissance sessile en présence de glucose et la croissance planctonique en conditions de stress thermique, oxydatif et acide tandis qu'elle améliore la croissance sessile en présence de sucrose et la capacité à survivre en conditions létales (Hou et al. 2014).

Chez les firmicutes, comme décrit précédemment dans le paragraphe II.2.c., l'activité protéasique de ClpP est spécifiée par son association avec les Clp-ATPases ClpX, ClpC et ClpE. L'absence de ClpE chez *O. oeni* restreint la diversité des complexes protéasiques chez cette bactérie. Cependant, comme souligné précédemment, ClpL2 pourrait en interagissant avec ClpP constituer un nouveau complexe ClpPL2 dégradant spécifiquement un substrat cible. De manière surprenante, le gène *clpP*, généralement situé à distance des gènes *clp* ou associé aux gènes *clpX* et *tig*, est organisé en opéron avec *clpL1* chez *O. oeni*. L'étude de l'opéron *clpP-clpL1* a montré différents niveaux de régulation de l'expression des deux gènes *clpP* et *clpL1* en réponse à un stress thermique ou éthanolique (Beltramo et al. 2004a).

II.4.2. FtsH

Egalement appelée HflB, **FtsH** est une protéase membranaire de 70 kDa Zinc-dépendante et **ATP-dépendante** pouvant jouer un rôle de régulateur. La protéine est active sous forme homo-oligomérique. Son extrémité amino-terminale contient deux segments transmembranaires tandis que son extrémité carboxy-terminale est cytoplasmique et comprend un domaine NBD caractéristique des protéines de la **famille AAA+** et un motif caractéristique des **protéases à Zinc** ou métalloprotéases (Gottesman et al. 1997; Janska et al. 2013). Essentiel chez *E. coli*, *L. lactis*, FtsH ne l'est pas chez *B. subtilis* et *L. plantarum*. Chez *L. plantarum*, la croissance à haute température est affectée chez le mutant $\Delta ftsH$ (Fiocco et al. 2009). La délétion du gène *ftsH* chez *B. subtilis* provoque un défaut de division cellulaire, de sporulation, de sécrétion des protéines et d'adaptation aux stress thermique et osmotique chez *B. subtilis*. La ressemblance des phénotypes des mutants *clpP* et *ftsH* laisse supposer la prise en charge de **cibles communes** par les deux protéases (Deuerling et al. 1995; Deuerling et al. 1997).

Chez *O. oeni*, le taux de transcrits de *ftsH* augmente suite à l'application de stress thermique et osmotique mais pas en présence d'éthanol, de sulfites ou de bromure d'éthidium. Le gène *ftsH* de

O. oeni permet la complémentation d'une souche de *E. coli* mutante pour ce gène confirmant la fonctionnalité de ce gène (Bourdineaud et al. 2003).

II.4.3. Lon et ClpQ

ClpQ, ou HslV chez *B. subtilis*, est une protéase **ATP-dépendante** active sous forme d'anneau hexamérique pouvant s'associer à la Clp-ATPase ClpY (HslU). ClpQ et ClpY peuvent exister séparément et s'oligomériser en présence d'ATP. ClpQ intervient dans le contrôle qualité des protéines en dégradant les protéines mal repliées ou endommagées par un stress thermique. Cette protéase a également pour substrats spécifiques les régulateurs SulA, RcsA et σ^{32} (Chandu and Nandi 2004; Simmons et al. 2008).

Lon est une protéase ATP-dépendante de 84 kDA constituée de quatre sous unités. Chaque sous-unité comporte un domaine protéolytique et un site de fixation à l'ATP (NBD). Comme FtsH, elle est active sous forme d'anneau homo-oligomérique. En absence d'ATP, la protéine peut dégrader des peptides de petites tailles de 5 à 10 acides aminés tandis qu'en présence d'ATP elle peut prendre en charge des protéines. Lon participe au contrôle qualité des protéines cellulaires soit en dégradant de manière spécifique des protéines cibles, majoritairement des régulateurs, soit en dégradant les protéines dénaturées ou altérées. Certaines bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* ne possèdent pas de gène *lon* dans leur génome, tandis que d'autres espèces comme *B. subtilis* et *M. xanthus* présentent deux copies de ce gène.

Chez *B. subtilis*, les deux gènes paralogues ***lonA*** et ***lonB*** situés en amont de *clpX* jouent un rôle dans la régulation post-traductionnelle des facteurs σ^H et σ^G nécessaires à la transcription des gènes impliqués dans le processus de sporulation. Leur expression est induite lors de chocs thermique ou oxydatif mais aussi par ajout de puromycine ou d'éthanol (Riethdorf et al. 1994; Schmidt et al. 1994; Tsilibaris et al. 2006). La mutation de *lonA* et *lonB* aboutit à une augmentation de la concentration en protéine σ^H dans des cultures à pH faibles. Il semble que Lon dégrade σ^H dans des environnements à pH faible, tandis qu'à pH neutre, l'activité de σ^H est activée par un mécanisme dépendant de ClpX (Liu et al. 1999). La fusion traductionnelle de ces deux gènes avec le gène *gfp* (*green fluorescent protein*) a permis à Simmons et al. de montrer une localisation sub-cellulaire de LonA et LonB évolutive en fonction des stades de développement

de *B. subtilis*. Ces travaux suggèrent une organisation spatio-temporelle de ces protéases vraisemblablement déterminée par la spécificité de substrat des protéases (Simmons et al. 2008).

Le génome de *O. oeni* comporte un gène *lon*-like localisé en amont de gènes putatifs codant des protéines de compétence (ComGBC). Aucun gène codant pour une protéine similaire à ClpQ n'a été identifié chez *O. oeni* (Grandvalet 2011).

II.4.4. HtrA

HtrA (High-temperature requirement A) (aussi appelée DegP, Do, DegS, DegQ) est une protéase à sérine ATP-indépendante associée à la membrane et hautement conservée. Sa séquence peptidique peut être décomposée en quatre régions : une région amino-terminale qui contient une **séquence signal de clivage** déterminant la localisation cellulaire de la protéine suivie de 50 acides aminés dont le rôle reste inconnu, une séquence faiblement conservée riche en proline, glutamine et sérine appelé **Q-linker**, une région centrale conservée indispensable à l'activité protéasique portant la **triade catalytique** [HDS] caractéristique des trypsin-like serine protéases (Lipinska et al. 1990) et une région carboxy-terminale comportant un ou deux domaines **PDZ** (nommées en référence aux protéines eucaryotes PSD-95, Dlg et zo-1 : post-synaptic density protein, disc large protein et zonula occludens-1 protein) (Pallen and Wren 1997; Ortega et al. 2009). Chez les bactéries firmicutes, la région carboxy-terminale ne comporte qu'un seul domaine PDZ et la région amino-terminale transmembranaire expose la triade catalytique à la surface de la cellule (Kim and Kim 2005). Le domaine PDZ a été initialement décrit chez les eucaryotes comme impliqué dans les interactions protéines-protéines. Les deux domaines PDZ détiennent l'information nécessaire à l'assemblage en hexamère de la protéine. Ils sont responsables de la reconnaissance du substrat et régulent l'activité protéasique en limitant l'accès du substrat à la cavité protéasique. La protéine DegP dénuée de ses deux domaines PDZ perd son activité protéasique et interfère dans l'assemblage hexamérique de la protéase native (Sassoon et al. 1999). L'unique domaine PDZ de DegS est responsable de la reconnaissance du substrat et de la régulation de l'activité protéasique. Le Q-linker est une région faiblement conservée dont la longueur varie d'un homologue à l'autre. Elle est constituée de 40 acides aminés pour DegP, de 20 acides aminés pour DegQ et est inexistante pour DegS. La plupart des enzymes HtrA ont un Q-linker semblable à celui de DegQ de *E. coli* (Kim and Kim 2005).

Cette protéine thermosenseur présente une double activité : chaperon moléculaire à basse température et protéase à haute température (Schumann 2007). HtrA confère aux bactéries une tolérance aux températures hautes (Lipinska et al. 1988; Lipinska et al. 1989; Lipinska et al. 1990; Skórko-Glonek et al. 1995; Skórko-Glonek et al. 1997). Chez les bactéries à Gram négatif, HtrA est impliquée dans le contrôle qualité des protéines périplasmiques (Pallen and Wren 1997). Chez les *streptococcaceae*, HtrA est impliquée dans la virulence, la croissance à hautes températures et la compétence (Lyon and Caparon 2004; Ahn et al. 2005; Kochan and Dawid 2013). En effet, chez *S. pneumoniae*, HtrA est un facteur de virulence majeure impliqué dans la capacité du pneumocoque à résister aux hautes températures, à la présence d'agent oxydant et la compétence de la bactérie. La délétion du gène *htrA* réduit les capacités de dissémination et d'inflammation de la bactérie dans le modèle murin (Ibrahim et al. 2004a; Ibrahim et al. 2004b; de Stoppelaar et al. 2013). HtrA limite également l'accumulation dans l'environnement cellulaire de la phéromone BplC impliquée dans l'activation du locus BlpAB transporteur de la pneumocine (Kochan and Dawid 2013). Chez *L. lactis*, HtrA est un facteur clef de la réponse au stress impliqué dans la protéolyse de surface à hautes températures et dans le contrôle qualité des protéines cellulaires en conditions optimales de croissance (Poquet et al. 2000). Le mutant délété pour le gène *htrA* est sensible à la chaleur, l'éthanol, la puromycine et au NaCl mais pas aux pH faibles, la présence de sels biliaires ou de peroxyde d'hydrogène (Foucaud-Scheunemann and Poquet 2003). La présence de plusieurs copies du gène dans le génome de nombreuses bactéries soulignent l'importance de HtrA. Chez *E. coli* et *B. subtilis*, trois copies du gène sont présents *degP*, *degS* et *degQ* pour la première et *htrA*, *yyxA* et *yvtA* pour la deuxième. Comme chez *S. pneumoniae*, *S. mutans*, la protéase HtrA de *B. anthracis* est un facteur de virulence majeur (Chitlaru et al. 2011).

Le génome de *O. oeni* ATCC BAA-1163 comporte **deux copies du gène *htrA*** (EAV39124.1 ; EAV39558.1). Cette duplication génétique s'étend à l'ensemble des *Leuconostocaceae* tandis qu'une seule copie de ce gène est présente dans le génome des bactéries lactiques. L'alignement des séquences peptidiques codées par ces gènes de *Leuconostocaceae* avec les séquences peptidiques des protéases HtrA de *L. lactis* et *E. coli* a permis de localiser les principales régions caractéristiques des protéases HtrA : la triade catalytique, le domaine membranaire dans la région amino-terminale et le domaine PDZ dans la région carboxy-terminale (Grandvalet 2011). Cet alignement révèle également que l'une des copies du gène code une protéine tronquée d'une

centaine d'acides aminés dans sa région amino-terminale correspondant au domaine PDZ. La séquence peptidique du Q-linker identifié se rapproche davantage de celle de DegP de *E. coli*.

11.5. **Autres familles protéines de stress**

Hsp33 est une protéine chaperon **ATP-indépendante** conservée et ubiquitaires chez les bactéries mais pas chez les eucaryotes supérieurs. Elle est principalement impliquée dans les mécanismes de défenses contre le stress oxydatif. Cette protéine de 33 kDa, codée par le gène *hslO* (*heat shock locus Oxydative stress induced*), possède 4 résidus **Cystéine** strictement conservés localisés au niveau de son extrémité carboxy-terminale (Cys232-234-265-268), dont **l'état d'oxydation** affecte la capacité d'interaction de Hsp33 avec ses protéines cibles dénaturées. En conditions optimales de croissance, la présence d'un ligand (Zn^{2+}) fixé au niveau des résidus cystéines induit une conformation monomérique inactive de la protéine. En revanche, en présence d'un agent oxydant tel que le peroxyde d'hydrogène, la libération du Zn^{2+} permet la formation de ponts disulfures entre les fonctions thiols (-SH) des résidus cystéines et induit une conformation oligomérique active de Hsp33 (2-8mers) (Janda et al. 2004). Chez *E. coli*, un stress oxydatif inactive DnaK et active Hsp33 (Winter et al. 2005). La protéase devient alors un chaperon hautement performant ne libérant ses protéines cibles qu'une fois le taux d'ATP restauré et les chaperons ATP-dépendants tels que DnaK totalement fonctionnels et disponibles (Dahl et al. 2015). Chez *Streptococcus oralis* et *Vibrio cholerae*, Hsp33 est respectivement impliquée dans la survie à pH faible et la résistance à l'hypochlorite de sodium (Wilkins et al. 2001; Wholey and Jakob 2012).

A l'instar des protéases ATP-dépendantes précédemment décrites, Hsp33 semble impliquée dans la régulation de facteurs de régulation. Chez *E. coli*, la surexpression de *hslO* permet la restauration du double mutant *Atig/dnaK* montrant ainsi que Hsp33 est un élément clef dans le réseau des protéines chaperones de *E. coli* (Bruehl et al. 2012). Hsp33 est conservé chez la majorité des bactéries lactiques, hormis chez les *Bifidobacterium*, ce qui pourrait expliquer leur forte sensibilité au stress oxydatif (Sugimoto et al. 2008). Un gène putatif codant potentiellement la protéase Hsp33 (EAV39162.1) a été identifié chez *O. oeni*. Aucune étude n'a rapporté la caractérisation de ce gène à l'heure actuelle.

Les **thioredoxines** sont des protéines ubiquitaires de 12kDa conservées chez de nombreuses bactéries. Comme Hsp33, la thioredoxine existe sous deux formes fonctions de l'état d'oxydation des deux cystéines de son site actif : réduites (dithiol) et oxydées (disulfites). Sous forme réduite, la thioredoxine fonctionne comme un donneur d'hydrogènes empêchant la formation de pont-disulfures qui inactivent certaines enzymes. Chez *O. oeni*, le gène *trxA* code une protéine 11,5 kDa dont la séquence présente 48% d'identité avec TrxA de *B. subtilis*. Ce gène exprimé à un niveau basal tout au long de la croissance complémente une souche mutante de *E. coli* déficiente pour la thiorédoxine et est induit après ajout d'H₂O₂ ou lors d'un choc thermique (Jobin et al. 1999a).

Les principales conséquences d'un stress thermique sont la dénaturation, voire l'agrégation des protéines, la déstabilisation des macromolécules telles que les ribosomes, l'altération de la fluidité membranaire et enfin la dénaturation des acides nucléiques (ARN et ADN). Des systèmes de protection et de réparation des acides nucléiques ont été décrits chez les bactéries telles que les protéines **Csp** (Cold Shock protein), chaperons des ARN mais aussi **RecA**, principale protéine impliquée dans la réparation de l'ADN mais ne seront pas détaillés dans ce travail de thèse.

II.6. Mécanismes de régulations de la réponse au stress.

II.6.1. Les régulons de la réponse au stress.

II.6.1.1. Les six régulons identifiés chez *B. subtilis*

La réponse au stress, traduite principalement par l'expression des gènes *hsp*, constitue un domaine étudié de manière approfondie chez *B. subtilis*, l'une des bactéries les plus étudiées chez les firmicutes. Chez *B. subtilis*, cinq mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *hsp* ont été caractérisés à ce jour. Ces régulons définissent chacun une classe regroupant l'ensemble des gènes *hsp* dont l'expression dépend d'un régulateur commun.

- Classe I : Régulon HrcA,
- Classe II : Régulon Sigma B (σ^B),
- Classe III : Régulon CtsR,
- Classe IV : Gènes dont l'expression est indépendante de HrcA, CtsR et σ^B ,
- Classe V : Gènes régulés par des systèmes à deux composantes,
- Classe VI : Gènes dont le mécanisme de régulation est inconnu.

Deux mécanismes de régulation des gènes peuvent être distingués : (i) une régulation négative par répression de la transcription : cas des gènes des Classe I et III (ii) une régulation positive par initiation de la transcription : cas des gènes des Classe II, IV et V une régulation dont le mécanisme n'est pas encore connu : cas des gènes de classe VI (Tableau 4).

Tableau 4 : Régulons impliqués dans la réponse au stress chez les firmicutes (Sugimoto et al. 2008)

Mécanisme de régulation	Régulateur	Gènes régulés chez <i>B. subtilis</i>
Contrôle positif	σ^B	<i>gspA</i> , <i>csbA</i> , <i>katE</i> ,... (Classe II)
	Inconnu	<i>htpG</i> (Classe IV)
	CssR/CssS	<i>htrA</i> , <i>htrB</i> (Classe V)
Contrôle négatif	HrcA	Opérons <i>groEL</i> , <i>dnaK</i> (Classe I)
	CtsR	<i>clpB</i> , <i>clpC</i> , <i>clpE</i> , <i>clpL</i> , <i>clpP</i> , ... (Classe III)
Contrôle inconnu	Inconnu	<i>ftsH</i> , <i>tig</i> , <i>clpX</i> , <i>lon</i> , ... (Classe VI)

II.6.1.1.a. Gènes de classe I : régulation par HrcA

La classe I regroupe les gènes codant les principaux chaperons moléculaires universels DnaK, DnaJ et GroESL. L'expression de ces gènes est régulée par le répresseur transcriptionnel HrcA (*Heat Regulation at CIRCE*). HrcA reconnaît une séquence nucléotidique palindromique consensus nommée CIRCE (*Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression*) et localisée au niveau des séquences promotrices (Hecker et al. 1996). En conditions optimales de croissance, le complexe HrcA, synthétisé sous forme inactive, est stabilisé par GroEL puis joue son rôle de répresseur en se fixant sur l'opérateur CIRCE. En conditions de stress, la répression par HrcA est transitoirement levée pour permettre l'expression des gènes de classe I. Le complexe GroEL, recruté pour le repliement des protéines endommagées, libère HrcA ce qui inactive le répresseur (Mogk et al. 1997). Chez la plupart des bactéries lactiques, l'opérateur CIRCE (TTAGCAGTC-N9-GAGTGCTAA) est conservé dans la région promotrices de l'opéron *dnaK* Figure 19).

II.6.1.1.b. Gènes de classe II : régulation par le facteur Sigma B

La classe II représente l'ensemble des gènes (125 gènes identifiés par microarray) dont l'expression est modulée par le facteur sigma B alternatif (σ^B). Le facteur σ^B interagit avec deux séquences consensus situées dans la région promotrice et permet le positionnement correcte de l'ARN polymérase (Petersohn et al. 2001). Il coordonne l'induction de ces gènes en réponse à des stress de différentes natures chez de nombreuses bactéries à Gram positif. Chez *B. subtilis*, il

intervient dans la réponse à divers stress tels que le stress thermique, osmotique, oxydatif, éthanolique et en conditions de carences nutritionnelles. Néanmoins, chez les bactéries lactiques aucun facteur sigma alternatif de type σ^B n'a été mis en évidence et le génome de *O. oeni* ne déroge pas à cette règle (Sugimoto et al. 2008).

II.6.1.1.c. Gènes de classe III : régulation par CtsR

L'expression des gènes de classe III, regroupant principalement les gènes *clp*, dépend de l'interaction du répresseur transcriptionnel CtsR (*Class Three Stress gene Repressor*) qui interagit avec une séquence opératrice directement répétée (A/GGTCAAANANA/GGTCAAA) localisée en amont du promoteur végétatif σ^A . Chez *B. subtilis*, CtsR agit comme un thermomètre moléculaire. La modification de sa conformation en conditions de stress diminue son affinité vis-à-vis de son opérateur permettant ainsi de lever la répression (Elsholz et al. 2010) des gènes de classe III. Le maintien de la dérégulation est possible grâce à la dégradation spécifique de CtsR par les complexes protéasiques ClpEP, ClpCP et ClpXP (Krüger and Hecker 1998; Derré et al. 1999b; Krüger et al. 2000). Les mécanismes de régulation de l'activité de CtsR seront présentés en détails dans la partie II.7.1. de cette synthèse bibliographique.

II.6.1.1.d. Gènes de classe IV : régulation indépendante de HrcA, CtsR et σ^B

La classe IV est représentée par le seul gène *htpG* dont l'expression est induite par un stress thermique indépendamment de HrcA, CtsR et σ^B . Si Schulz et al. suggère un contrôle négatif en montrant une augmentation de l'expression basale de *htpG* lors de la délétion de la région en amont du promoteur putatif σ^A dépendant (Schulz et al. 1997), le mécanisme de régulation de ce gène reste flou. En 2003, la même équipe décrit un contrôle positif thermosensible due à la présence d'une séquence [GAAAAAGG] en aval de la boîte -10 du promoteur σ^A -dépendant. L'inversion de deux bases dans cette séquence supprime l'induction thermosensible tandis que la fusion de cette séquence avec le promoteur végétatif *lepA* lui confère un caractère thermoinductible (Versteeg et al. 2003). L'activateur transcriptionnel interagissant avec cette séquence n'a pas encore été identifié à ce jour.

II.6.1.1.e. Gènes de classe V : régulation par un système à deux composants.

La classe V regroupe les gènes dont l'expression est régulée par des systèmes à deux composants ou TCS (*Two-Components Systems*). Chez *B. subtilis*, les gènes *htrA* et *htrB*, sont sous le contrôle du TCS CsrR/CsrS (Westers et al. 2006). Les TCS sont généralement assimilés à des systèmes de communication intercellulaire ou « crosstalk » qui permettent à une population de bactéries de s'adapter aux conditions environnementales en coordonnant l'expression des gènes nécessaires à la réponse au stress détecté. Ils améliorent ainsi l'adaptation et la survie bactérienne. Les TCS sont constitués d'une histidine kinase membranaire (HK) dite « protéine senseur » qui détecte un stimulus environnemental spécifique et d'un élément régulateur (ER) cytoplasmique initiant la réponse transcriptionnelle. Le stimulus périplasmique détecté par l'HK entraîne l'autophosphorylation de la protéine sur un résidu histidine. Le phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate de l'ER qui change de conformation et initie une réponse transcriptionnelle adaptée au stimulus (Mascher 2006). Chez *O. oeni*, la recherche de TCS par Blast a abouti à l'identification de cinq ER contigus à une histidine kinase potentielle et se rapportant majoritairement à la famille de OmpR, famille la plus représentée chez les *Lactobacillaceae* (Zúñiga et al. 2011). Il est intéressant de noter qu'un de ces TCS [OEOE_0105/OEOE_0106] est contigu au gène *htrA* de *O. oeni* suggérant une régulation de l'expression de l'enzyme par ce TCS (Grandvalet 2011).

II.6.1.1.f. Classe VI : régulation inconnue

Cette classe regroupe tous les gènes induits en réponse à un stress dont le mécanisme de régulation de l'expression n'est pas encore connu (Schumann 2003).

II.6.1.2. Cas des bactéries lactiques : Corégulation par HrcA et CtsR

Chez les bactéries lactiques, l'identification des mécanismes de régulation de la réponse au stress est encore à l'état d'ébauche en comparaison au paradigme *B. subtilis*. Les régulateurs négatifs HrcA et CtsR sont conservés et cofonctionnent chez la plupart des firmicutes et des bactéries lactiques (Figure 19). Chez les *bacillaceae* (*B. anthracis*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* et *L. inocua*) les deux régulateurs sont distincts, sauf pour les *staphylococcaceae*, tandis que chez les *Streptococcaceae* (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *L. lactis* et *S. salivarius*), ils sont partiellement chevauchants. *L. bulgaricus*, *L. gasseri* et

O. oeni se distinguent des autres *Lactobacillaceae* par un mécanisme de régulation de la réponse au stress orchestré par un seul répresseur HrcA ou CtsR. La diversité quant à la répartition des régulons chez les *Lactobacillaceae* rend difficile le choix d'un organisme de référence des bactéries lactiques à l'instar de *B. subtilis* pour les bactéries firmicutes.

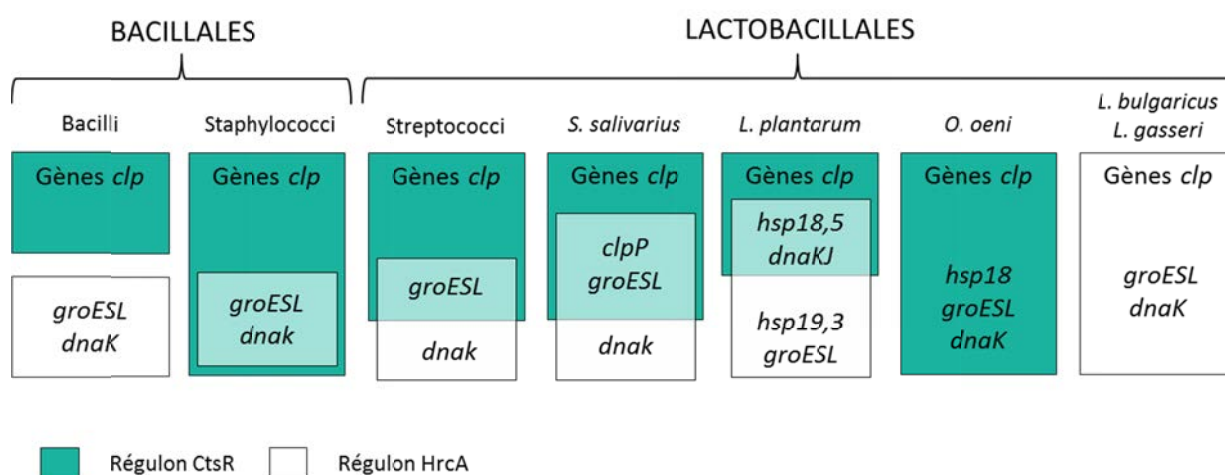


Figure 19 : Corégulation par CtsR et HrcA des gènes *hsp* chez différentes bactéries firmicutes à faible pourcentage en bases GC (Chastanet et al. 2001; Chastanet and Msadek 2003; Grandvalet et al. 2005; Spano and Massa 2006; Frees et al. 2007; van Bokhorst-van de Veen et al. 2013).

II.6.1.3. *O. oeni* : un cas à part

De par sa capacité à croître au sein d'un environnement défavorable tel que le milieu vin et l'organisation génétique atypique de gènes *hsp*, *O. oeni* représente un modèle particulièrement intéressant pour étudier la réponse au stress. L'analyse complète du génome de *O. oeni* ATCC BAA-1163 souligne l'absence de gène codant un facteur σ^B , commune à l'ensemble des bactéries lactiques, et l'absence de gène *hrcA* et de séquence opératrice CIRCE. Actuellement, seul le régulateur négatif CtsR a été identifié chez *O. oeni*, il régule l'expression de la majorité des gènes *hsp* (Grandvalet et al. 2005). Peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes de régulation des gènes dont l'expression est indépendante de CtsR.

L'analyse du génome de *O. oeni* ATCC BAA-1163 a permis la caractérisation du gène *ctsR* par homologie avec le gène *ctsR* de *B. subtilis*. Le produit de ce gène partageant 50% d'identité avec la séquence peptidique du régulateur CtsR de *B. subtilis*.

Des sites opérateurs reconnus par CtsR ont été localisés dans la région promotrice des gènes *ctsR*, *hsp18*, *cbpA*, *clpP*, *grpE*, *groES*, *groEL*, *clpC*, *clpL1* et *clpL2* de la souche *O. oeni* ATCC BAA-

1163 (Figure 20) (Grandvalet et al. 2005). La bactérie étant particulièrement réfractaire aux manipulations génétiques, le régulon CtsR a été caractérisé en système d'expression hétérologue chez *B. subtilis*. L'utilisation de fusions transcriptionnelles entre les régions promotrices des gènes potentiellement régulés par CtsR et le gène rapporteur de la β -galactosidase a permis de montrer que l'expression des gènes *hsp18*, *clpL2* et des opérons *ctsR-clpC*, *clpP-clpL1*, *grpE-dnaK-cbpA* et *groES-groEL* est réprimée par CtsR en conditions optimales de croissance. Ces gènes constituent le régulon CtsR de *O. oeni* (Figure 20) (Grandvalet et al. 2005). Comme décrit chez *B. subtilis*, CtsR régule sa propre expression.

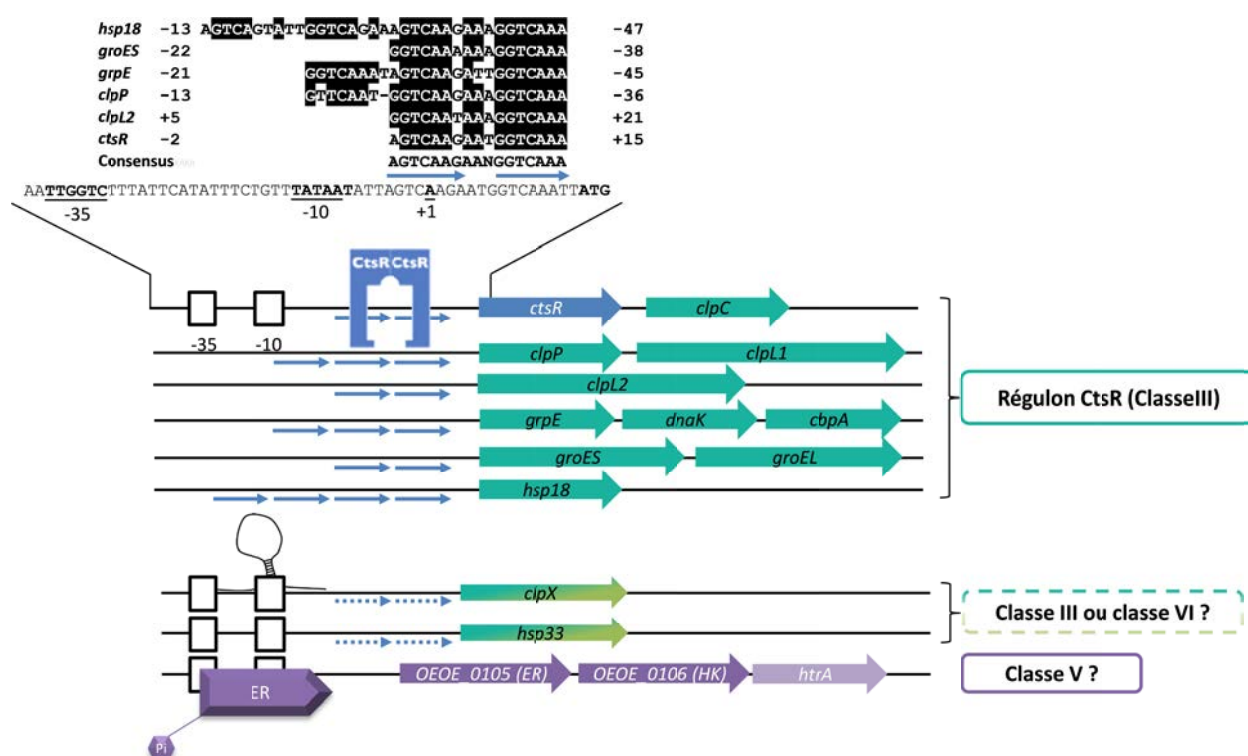


Figure 20 : Organisation du régulon CtsR et des gènes induits lors d'un stress (*hsp33*, *htrA* et *clpX*) de *O. oeni* ATCC BAA-1163 et alignement des sites de fixation de CtsR identifiés dans les promoteurs des gènes *ctsR*, *hsp18*, *grpE*, *groES*, *clpP* et *clpL2* (Grandvalet et al. 2005). Le schéma récapitulant le système de régulation des gènes induits lors d'un stress (*hsp33*, *htrA* et *clpX*), a été établi à partir des hypothèses émises après analyse des séquences promotrices des gènes *clpX*, *hsp33* et *htrA*. (Jobin et al. 1999b; Grandvalet 2011).

Actuellement, CtsR constitue l'unique régulateur de l'expression des gènes induits lors d'un stress décrit chez *O. oeni*. Néanmoins ce régulateur ne contrôle pas l'expression de *clpX*. L'étude de la région promotrice du gène *hsp33* et des deux gènes *htrA*-like de *O. oeni* montre la présence de séquences opératrices partielles potentiellement reconnues par CtsR. Nous pouvons donc nous interroger sur le mécanisme de régulation de l'expression de ces *hsp*. A l'instar de *B. subtilis*, le

mécanisme de régulation de l'expression du gène *clpX* de *O. oeni* n'a pas encore été élucidé. L'organisation de son cluster (*tig-clpX*) est relativement classique et comparable à celles rencontrées chez *B. subtilis* (*tig-clpX-lonA-lonB*) ou *E. coli* (*tig-clpP-clpX-lonA*) (Gottesman et al. 1993; Gerth et al. 1996). La proximité des gènes *tig* et *clpX* est commune à de nombreuses bactéries lactiques. L'analyse de sa séquence promotrice, située au sein de la phase codante du gène *tig*, révèle la présence de la séquence opératrice relative à CtsR qui ne semble pas reconnue par le régulateur (Grandvalet et al. 2005). Néanmoins, la région 5' UTR (5' UnTranslated Region) semble indiquer plusieurs options de régulation possibles : une régulation post-transcriptionnelle par un mécanisme de type terminaison-antiterminaison ou un mécanisme de régulation par ARN régulateur (Figure 20) (Jobin et al. 1999b).

Actuellement, il est difficile d'établir une hypothèse quant à la régulation de l'expression de *hsp33*. Aucune donnée n'est actuellement disponible chez *E. coli* ou *B. subtilis*. L'analyse de sa région promotrice a mis en évidence la conservation de signaux de transcription σ^A -dépendants et une conservation partielle de la séquence opératrice de CtsR ce qui suggère une régulation par une fixation incomplète de CtsR ou par un mécanisme post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle (Figure 20). Les études menées sur sa structure protéique ont montré que Hsp33 est sous conformation active uniquement lors d'un stress oxydatif ce qui laisse entrevoir un premier mécanisme de régulation post-traductionnel (Janda et al. 2004).

Concernant la régulation de l'expression de *htrA*, la contiguïté d'une des copies du gène avec un des gènes codant un TCS putatif [OEOE-0105/OEOE_0106] suggère que ce système de senseur-régulateur régule l'expression de *htrA* chez *O. oeni* et classerait alors ce gène dans la classe V, à l'instar des gènes *htrA* et *htrB* de *B. subtilis* régulés par le TCS CssS/CssR (Westers et al. 2006). Cette régulation hypothétique d'une activité protéasique chez *O. oeni* est d'autant plus crédible qu'elle a auparavant été décrite chez la bactérie lactique *L. acidophilus* (Azcarate-Peril et al. 2005).

II.7. Activité du répresseur transcriptionnel CtsR et sa régulation

II.7.1. Régulation de l'activité de CtsR chez *B. subtilis*

Conservé chez de nombreuses bactéries firmicutes à faible % en bases GC, le répresseur transcriptionnel CtsR et la régulation de son activité ont été largement étudiés et approfondis chez *B. subtilis*. CtsR agit sous forme de dimère en se fixant sur une séquence heptanucléotidique directement répétée qui constitue son site opérateur (Derré et al. 2000).

La séquence peptidique de CtsR peut se décomposer en trois domaines fonctionnels :

- Une extrémité amino-terminale impliquée dans la dimérisation du régulateur (25 premiers acides aminés),
- Un domaine de type Hélice-Boucle-Hélice (HTH) qui lui permet d'interagir avec l'ADN au niveau de son site opérateur (Krüger et al. 1997),
- Une région centrale riche en résidus Glycine qui lui permet d'agir comme un thermosenseur (Figure 22, Figure 21) (Derré et al. 2000; Elsholz et al. 2010).

Le rôle de l'extrémité carboxy-terminale reste inconnu, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la résistance à l'activité des protéases et que les protéines qui en sont dépourvues soient instables *in vivo* (Derré et al. 2000). L'alignement de séquence peptidique de CtsR issu des principaux firmicutes à faible % GC montre la conservation des principaux domaines représentatifs de la protéine CtsR au sein des différentes espèces (Figure 22).

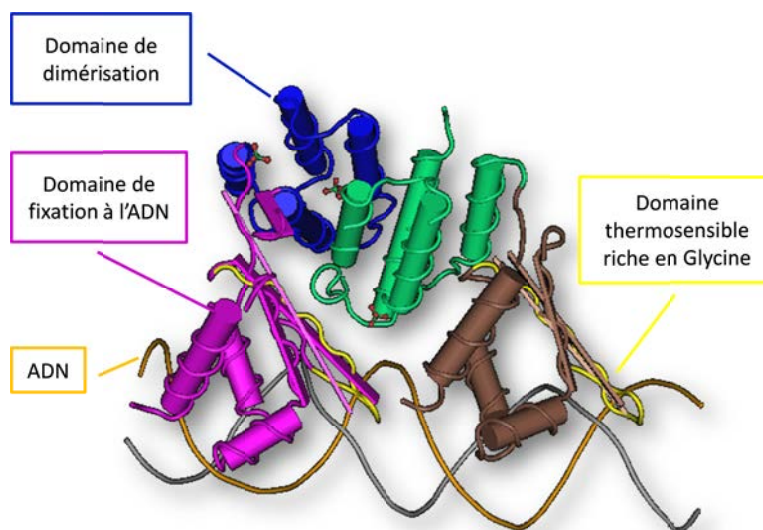


Figure 21 : Représentation en 3D de la structure d'un dimère de CtsR fixé sur une molécule d'ADN. Figure établie avec le logiciel Cn3D à partir de la structure obtenue par cristallographie d'après (Fuhrmann et al. 2009). Les cylindres représentent les structures en hélice α , les flèches les structures en feuillet β .

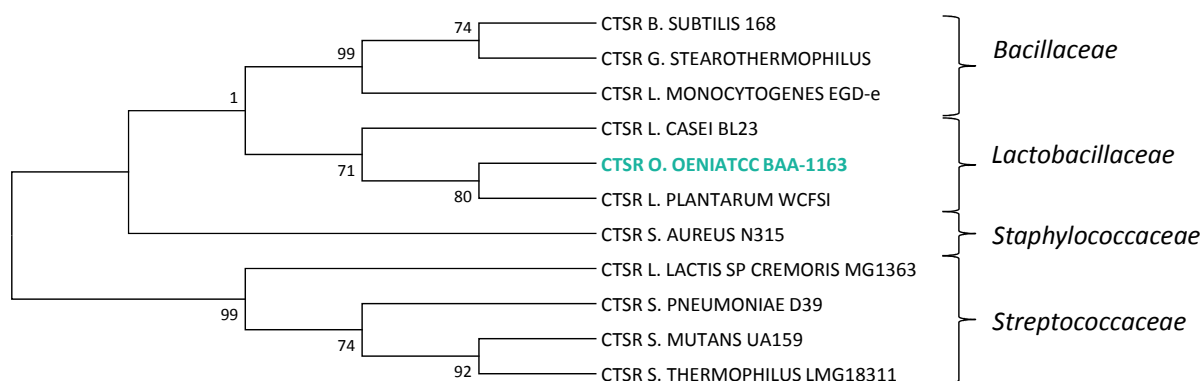
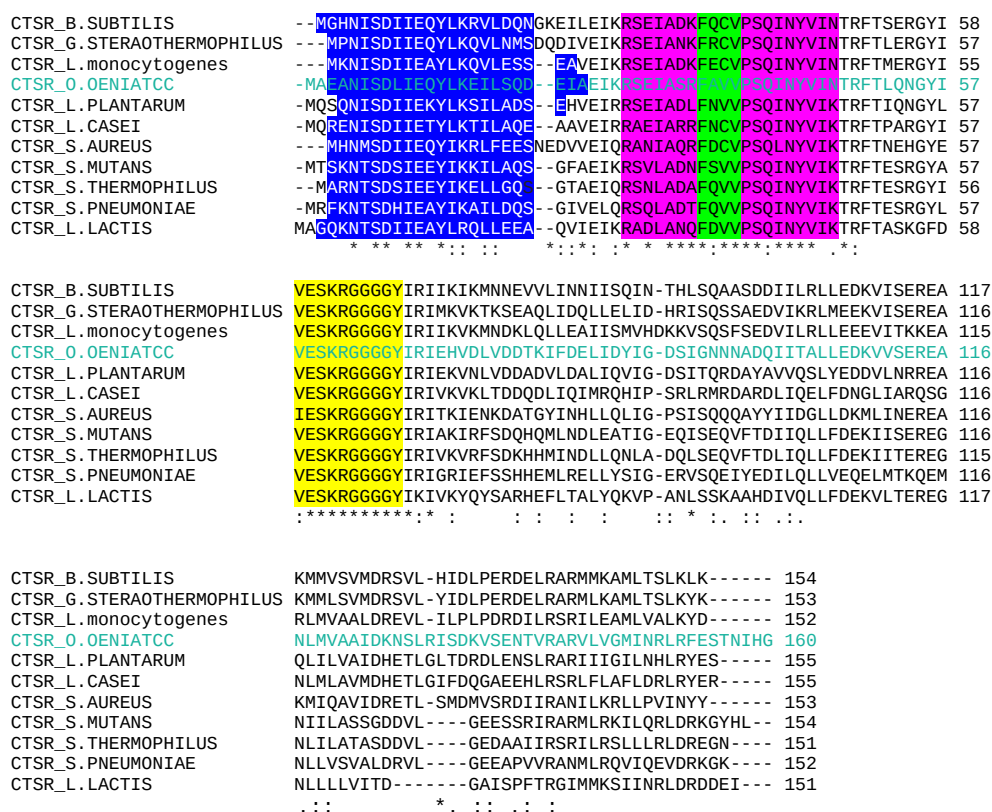


Figure 22 : Alignement par ClustalW des séquences peptidiques des CtsR des principales bactéries firmicutes dont *O. oeni* ATCC BAA-1163 et l'arbre phylogénétique déduit de cet alignement. L'extrémité amino-terminale (25 premiers acides aminés en **bleu**) est impliquée dans la dimérisation, le motif hélice-boucle-hélice (**rose-vert-rose**) dans la fixation à l'ADN et la région centrale riche en glycine (**jaune**) est impliquée dans le caractère thermosensible de CtsR. Méthode des plus proches voisins utilisant le modèle de Poisson. L'arbre est construit par mesure des distances moyennes calculées à partir du % d'identité des séquences peptidique issus de l'alignement ci-dessus.

Krüger et son équipe sont les premiers à s'intéresser à l'opéron *ClpC* de *B. subtilis* composé de six gènes dont le gène *ctsR*. Ils ont montré par l'interruption de *ctsR* une augmentation du niveau basal d'expression de l'opéron et de *clpP*. Ils suggèrent ainsi un rôle de régulateur négatif de CtsR sur l'opéron *clpC* et le gène *clpP*. La technique de retard sur gel a également permis de

mettre en évidence un site de fixation de CtsR situé entre la boîte -10 et le site de fixation du ribosome (*RBS : ribosome binding site*) (Krüger et al. 1997; Krüger and Hecker 1998). Par la suite, la mutagenèse dirigée combinée à la technique d'empreinte (footprinting) ont permis de caractériser la séquence cible de CtsR : une séquence directement répétée de sept nucléotides séparés par trois nucléotides [A/GGTCAAA NAN A/GGTCAAA], fortement conservée chez les fimicutes et localisée en amont des gènes *clp*, *dnaK* chez *S. aureus* et *shsp* chez *O. oeni* et *S. thermophilus* (Derré et al. 1999b).

Dès les années 2000, Derré et al. montrent que CtsR et les gènes de son régulon sont faiblement exprimés et leur expression est maintenue à un niveau basal par une dégradation spécifique de CtsR à 37°C par le complexe protéolytique ClpXP en conditions optimales de croissance. ClpC aurait alors un rôle de chaperon impliqué dans le repliement et la protection de CtsR contre le complexe ClpXP. Leurs travaux montrent également que CtsR est actif sous forme de dimère (Derré et al. 2000). Par la suite, les travaux de Krüger et son équipe montrent une régulation de l'activité de CtsR basée, d'une part, sur un maintien sous forme active à un niveau basal en conditions optimales de croissance, et d'autre part, sur une dégradation rapide CtsR à haute température par le complexe ClpCP (Krüger et al. 2001). Ils proposent également pour la première la fois l'implication des deux protéines McsA et McsB, codées par deux gènes faisant partie de l'opéron *clpC*, dans le contrôle de l'activité de CtsR. Le motif en doigts de zinc de McsA permet à la protéine de se fixer sur CtsR et de le stabiliser en conditions optimales de croissance. A l'inverse, lors d'un stress, McsB peut inactiver CtsR en l'adressant au complexe protéasique ClpCP. Le caractère thermosenseur de CtsR décrit par la suite par Elsholz et al. a permis d'expliquer la réponse rapide et efficace des cellules face à une augmentation de température (Elsholz et al. 2010).

Les travaux de Kirstein et son équipe sur le contrôle de l'activité de CtsR par un mécanisme de phosphorylation *via* les protéines McsA et McsB associés aux travaux de Elsholz et ses collaborateurs sur la thermostabilité de CtsR ont donné lieu au modèle de thermorégulation de l'activité de CtsR présenté Figure 23 (Kirstein et al. 2005; Kirstein et al. 2007; Elsholz et al. 2010).

En absence de stress thermique, CtsR interagit avec son site opérateur et réprime l'expression des gènes de son régulon. ClpC associée aux deux protéines adaptatrices McsA et McsB, inhibe

l'activité kinase de McsB (Elsholz et al. 2011a). (1) L'augmentation de la température provoque une modification conformationnel de CtsR entraînant une baisse d'affinité pour le site opérateur. Ceci aboutit au décrochement de CtsR de son site opérateur et permet ainsi la transcription des gènes de son régulon. (2) La dénaturation des protéines intracellulaires entraine une titration de ClpC qui se dissocie du complexe ClpC/McsA/McsB. L'inhibition de l'activité kinase de McsB par ClpC est levée et MscB autophosphoryle spécifiquement ses propres résidus Arginine (R29,R190, R255, R269 et R272) (Elsholz et al. 2011a). (3) Assisté de McsA, McsB se fixe sur CtsR par l'intermédiaire de son motif en doigt de zinc et l'adresse à ClpCP. Le complexe protéasique ClpCP dégrade alors CtsR. (4) Au-delà de 30 minutes, la désactivation de McsB par déphosphorylation par la phosphatase YwlE ou par dégradation par le complexe ClpCP rétablit l'activité du répresseur. La synthèse de CtsR due à la dérégulation permet sa fixation sur l'opérateur avec une possible l'intervention de l'activité chaperon de ClpC qui n'est plus requise par les protéines thermolabiles du cytoplasme.

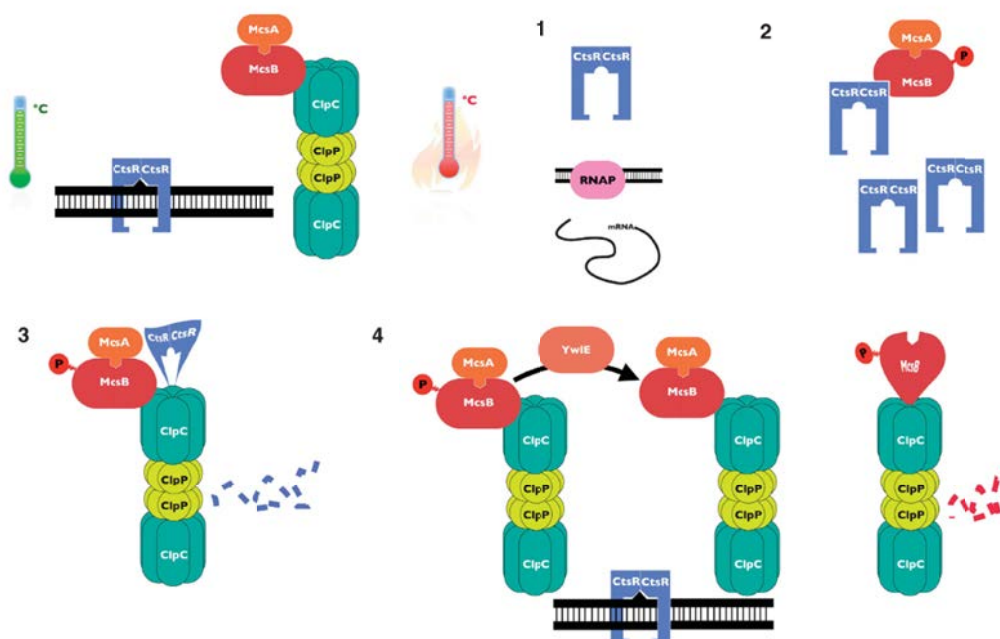


Figure 23 : Modèle de la thermorégulation de l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR chez *B. subtilis* proposé par (Elsholz et al. 2010).

La présence de McsA conditionne l'activité de la protéine adaptatrice McsB. Le contact permanent entre ces deux protéines n'est interrompu qu'en présence de stress oxydatif. (Elsholz et al. 2011b; Elsholz et al. 2011a). McsB possède deux fonctions distinctes dépendantes de son interaction avec McsA. Lorsqu'il est associé à McsA, son activité kinase est stimulée. McsB

s'autophosphoryle et sert alors d'adaptateur entre CtsR et le complexe protéasique ClpCP contrôlant ainsi la dégradation de CtsR. Lorsqu'il n'est pas associé à McsA, McsB est capable de décrocher CtsR de son site opérateur permettant ainsi la transcription des gènes du régulon. Cette seconde activité est rencontrée lors d'un stress oxydatif. La présence d'agent réducteur provoque l'oxydation de fonctions thiols particulières des résidus cystéines du motif en doigts de zinc de McsA provoquant l'interruption de l'interaction entre McsA et McsB. McsB libéré interagit avec CtsR fixé sur son site opérateur et le décroche permettant la transcription des gènes du régulon (Figure 24, 1-3) (Elsholz et al. 2011b).

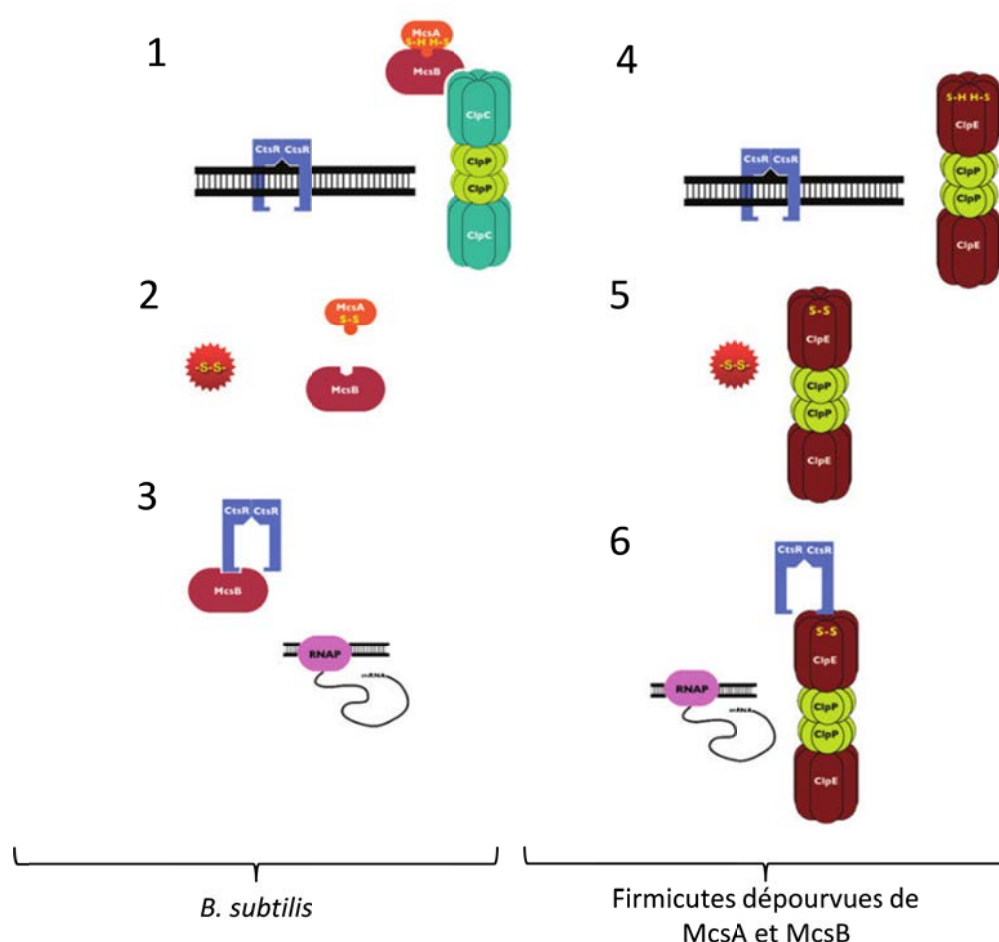


Figure 24 : Régulation de l'activité de CtsR lors d'un stress oxydatif (Elsholz et al. 2011).

11.7.2. Quels mécanismes de régulation de l'activité CtsR chez les bactéries dépourvues de McsA et McsB ?

La conservation de l'organisation de l'opéron *clpC* chez les *Staphylococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Listeriaceae* et les autres *Bacillaceae*, laisse supposer une régulation de l'activité de CtsR

comparable à celle précédemment décrite chez *B. subtilis* impliquant les protéines adaptatrices codées par les gènes *mcsA* et *mcsB*. En ce qui concerne les *Leuconostocaceae*, *Sreptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae* et *Lactobacillaceae*, l'absence des gènes *mcsA* et *mcsB* au sein de l'opéron *clpC* nous interroge sur le mécanisme de régulation de l'activité de CstR en l'absence de ces gènes. Dans le cas de l'opéron *clpC* de *O. oeni*, le **chevauchement des gènes *clpC* et *ctsR*** est une nouvelle singularité qui s'ajoute au palmarès du génome de la bactérie.

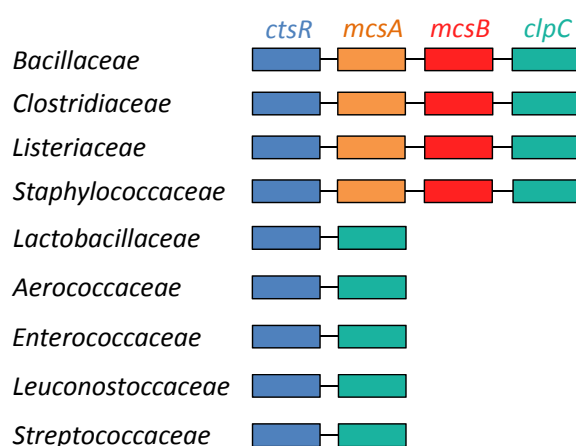


Figure 25 : Organisation de l'opéron ClpC chez différents phylum de bactéries fimicutes à faible %GC (Elsholz et al. 2010; Grandvalet 2011).

L'opéron ClpC de *L. lactis* a été caractérisé par Varmanen et al. (2000). La délétion du gène *ctsR* a permis de montrer que CtsR régule l'expression des gènes *clp* chez *L. lactis* (Varmanen et al. 2000). L'absence de gènes *mcsA* et *mcsB* associé à l'opéron ClpC dans le génome de *L. lactis*, laisse supposer un mécanisme de régulation de l'activité de CtsR différent de celui décrit pour *B. subtilis*. Chez *L. lactis*, l'interruption du gène *clpE* provoque un retard dans le rétablissement de la répression des gènes du régulon par CtsR. Tandis que l'interruption de *clpC* ne provoque aucune modification dans l'expression du régulon CtsR. La protéine **ClpE** serait donc impliquée dans le contrôle de l'activité de CstR (Varmanen et al. 2003). De manière plus approfondie, il semble que ClpE, à l'instar de McsA chez *B. subtilis*, interagisse avec CtsR grâce son motif en doigts de zinc à l'extrémité amino-terminale. Il est d'ailleurs possible de restaurer la répression des gènes du régulon par CtsR en substituant le gène *clpE* par *mcsA*. ClpE pourrait être une protéine chaperon qui stabilise CtsR et module son activité en le protégeant de la dégradation par la protéase ClpP en absence de stress. En revanche, lors d'une augmentation de température, ClpE pourrait s'associer à ClpP et former un complexe protéasique capable de dégrader CtsR. Récemment, Elsholz et al. ont confirmé les hypothèses de Varmanen et al. et ont montré que la

protéine ClpE peut remplacer ClpC lors d'un stress oxydatif et s'associer à ClpP (Figure 24) (Varmanen et al. 2003; Elsholz et al. 2011b).

Récemment, les travaux de Tao et Biswas ont montré le rôle chaperon de **ClpL** dans la régulation de l'activité de CtsR chez *S. mutans* (Tao and Biswas, 2013). La délétion du gène *clpL* provoque l'accumulation de CtsR sous forme inactive et agrégative. Lors d'un stress, la régulation de CtsR ne semble pas passer par une étape de dégradation par ClpP mais au contraire par le maintien sous forme active en conditions optimales de croissance. La détection d'un duplex CtsR-ClpL confirme cette hypothèse. De plus, aucun motif de fixation à ClpP n'est présent sur la séquence de la protéine ClpL de *S. mutans* ce qui exclue un rôle d'adaptateur comme précédemment décrit pour la protéine McsA chez *B. subtilis* ou ClpE pour *L. lactis*. Plus précisément, l'expression de ClpL tronquée de son domaine D2-small carboxy-terminal ne permet pas de maintenir CtsR sous sa forme active, ce qui suggère l'implication de ce domaine de ClpL dans le repliement sous forme active de CtsR (Tao et al. 2012; Tao and Biswas 2013b).

Les principaux acteurs de la régulation de l'activité de CtsR décrits chez *B. subtilis* et *L. lactis* (*clpE*, *mcsA* et *mscB*) sont absents du génome de *O. oeni* tandis que deux versions du gène *clpL* sont présentes. L'arbre phylogénétique construit précédemment à partir de l'alignement des séquences peptidiques des sous-familles ClpE et ClpL montrait un rapprochement de ClpL2 avec la famille ClpE (Figure 18). Cependant, l'absence du motif en doigts de zinc dans la séquence peptidique de ClpL2 exclut un mécanisme de régulation similaire à celui proposé par Varmanen et al. chez *L. lactis* (Varmanen et al. 2003). En revanche, l'implication de la protéine ClpL dans la stabilisation de CtsR chez *S. mutans* suggère une action similaire de chaperon stabilisateur de ClpL1 ou ClpL2 chez *O. oeni*. En outre, la présence du tripeptide [VGF] impliqué dans l'association à ClpP chez ClpL2 souligne une possible présentation de CtsR par ClpL2 au complexe protéasique pour dégradation.

Cependant chez *L. lactis*, ClpE interagit avec CtsR *via* son motif en doigts de zinc. L'absence de ce motif chez ClpL1 et ClpL2 rend peu probable une interaction avec le régulateur. Il est toutefois important de souligner que la protéine ClpL de *S. mutans* interagit avec CtsR par l'intermédiaire de son domaine D2-small, un domaine totalement conservé au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de ClpL1 et ClpL2 (Figure 16). Cette observation rend envisageable l'intervention d'une des deux ClpL, ou les deux dans la régulation de l'activité de

CtsR chez *O. oeni* (Figure 26). En outre, l'intervention d'une protéine adaptatrice de type McsA est également envisageable.

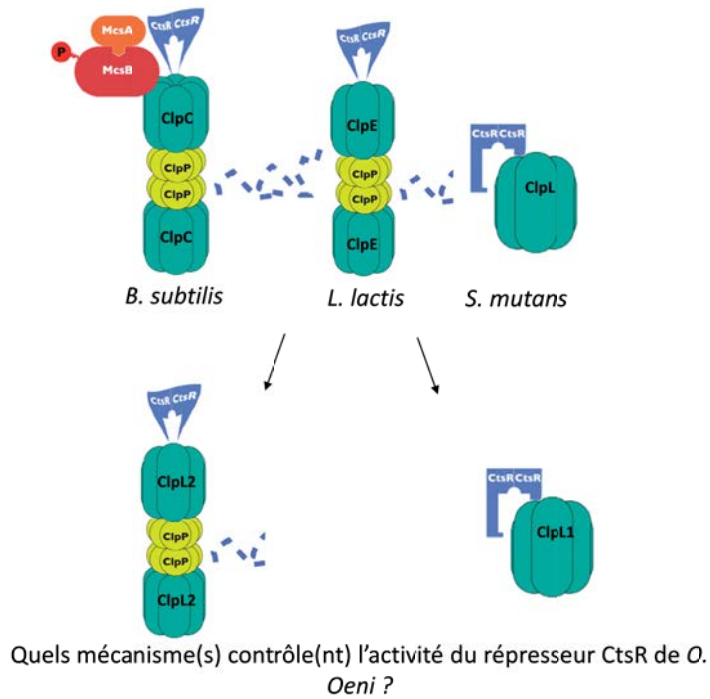


Figure 26 : Récapitulatif des mécanismes de régulation de l'activité de CtsR chez les firmicutes.

III. Analyse fonctionnelle des gènes chez *O. oeni*: une bactérie capricieuse.

L'analyse fonctionnelle d'un gène repose principalement sur l'étude du phénotype de la souche mutée pour ce gène. La construction de mutants constitue alors la première étape de l'étude. En effet, Kammerer écrit « Les organismes vivants dont l'analyse génétique est la plus approfondie sont les mieux connus et les plus aisément modifiables. L'analyse des mutants apporte des informations essentielles sur la fonction des gènes mutés, leur organisation et leur régulation (Kammerer 1996). Cependant, chez la plupart des bactéries lactiques, et plus particulièrement chez *O. oeni*, le manque évident d'outils génétiques restreint l'exploration fonctionnelle des gènes. L'approche moléculaire est d'autant plus limitée que *O. oeni* est particulièrement réfractaire à l'entrée d'ADN exogène et ce quel que soit la méthode de transfert génétique appliquée. Jusqu'à présent, l'exploration fonctionnelle des gènes de *O. oeni* se fait par analyse comparative avec des gènes caractérisés chez d'autres microorganismes, par l'utilisation de système d'expression hétérologue ou par approche *in vitro* utilisant des protéines purifiées. Ainsi, *O. oeni* n'étant pas une bactérie facilement manipulable, la construction de mutants reste inaccessible à ce jour. Cependant, l'étude de l'ADN extra-chromosomique ainsi que l'élaboration de méthodes de transferts génétiques puis le développement de vecteurs sont des domaines qui ont reçu une attention considérable durant ces trente dernières années.

III.1. Les différents modes de transferts

De nombreuses techniques permettent le transfert génétique d'ADN exogène chez les bactéries. La conjugaison, l'électroporation et la transduction sont les plus couramment utilisées, tandis que la biolistique, la transformation naturelle ou la chimiocompétence sont davantage spécifiques à certains genres bactériens. Parmi les méthodes de transferts, nous pouvons distinguer les méthodes naturelles et les transferts artificiels développés pour l'analyse fonctionnelle des gènes. Ce paragraphe ne détaillera que les méthodes de transferts applicables ou potentiellement applicables à *O. oeni*.

III.1.1. Les transferts naturels

III.1.1.1. La conjugaison

La conjugaison est un phénomène de transfert unidirectionnel d'ADN entre une bactérie « donneuse » et une bactérie « receveuse » via la formation d'un pont cytoplasmique impliquant un contact étroit entre les deux bactéries. Tandis que chez les bactéries à Gram négatif, et plus particulièrement chez *E. coli*, le contact entre les bactéries s'établit par l'intermédiaire d'un *pilus*. Chez les bactéries à Gram positif, la bactérie envoie un signal via une phéromone afin d'activer les régulateurs Tra impliqués dans la formation d'un relaxosome au niveau de l'origine de transfert (*oriT*) intervenant dans le processus de transfert d'ADN. Les gènes *tra* peuvent être portés par un plasmide dit « mobilisable » ou un plasmide « helper » ou par le chromosome. Seul un brin du plasmide mobilisable est transféré dès la coupure au site *nick* par une ADN relaxase. Le simple brin est alors ligué puis répliqué dans la cellule receveuse et la cellule donneuse (Figure 27). Ce transfert d'ADN est conservatif et il est possible entre deux bactéries d'espèces ou de genres bactériens différents et même entre bactéries et cellules eucaryotes telles que les plantes et les levures.

Zúñiga et al. décrivent pour la première fois ce phénomène chez *O. oeni* en 1996. Deux transposons Tn925 et Tn916 de 15 kpb et 17 kpb ont été transférés par conjugaison de *Enterococcus faecalis* vers *O. oeni*. Ces deux transposons portent le gène de résistance à la tétracycline et sont capables de promouvoir leur propre transfert entre cellules. La fréquence de transfert varie de 1×10^{-6} à 1×10^{-8} transconjugants par cellule réceptrice selon la souche réceptrice utilisée. Les transposons se sont intégrés à différents sites du chromosome de manière non aléatoire. *O. oeni* s'est également révélé capable d'agir comme une cellule donneuse dans le cas d'une conjugaison avec *Lactococcus lactis* (Zúñiga et al. 1996a).

Les plasmides pIP501 et pVA797 (Cf. III.2.b) ont également été transférés chez *O. oeni* par conjugaison avec *L. lactis* comme cellule donneuse. La fréquence de transfert varie entre 6×10^{-6} et 4×10^{-8} selon la souche réceptrice. Dans les deux cas, les plasmides, instables d'un point de vue structural, subissent d'importantes délétions au niveau des gènes *tra*, nécessaire au transfert par conjugaison et du gène *segB*, nécessaire à la stabilité des plasmides. Ceci pourrait expliquer l'instabilité ségrégationnelle des plasmides dérivés du pIP501 et pVA797 (Zúñiga et al. 2003). Ces deux vecteurs ont, par la suite, été utilisés comme plasmides « helper » lors du transfert

conjugatif du pGID052 (Cf. III.2.b.) avec comme cellules donneuses *E. faecalis* ou *L. lactis* (Beltramo et al. 2004b). La fréquence de transfert varie de 2.3×10^{-6} à 2.2×10^{-7} transconjugants par cellule receveuse.

III.1.1.2. La transduction

La transduction est une technique de transfert d'ADN par l'intermédiaire d'une particule phagique. Le bactériophage peut infecter une cellule bactérienne et lui transférer son ADN selon deux cycles d'infection différents. Lors d'un cycle lytique, le bactériophage ou son ADN pénètre dans la cellule et se réplique. Le cycle aboutit à la lyse de la cellule hôte et conduit à la libération des copies du phage dans le milieu. Lors d'un cycle lysogénique, l'ADN phagique est intégré sous forme de prophage dans le génome bactérien puis se réplique lors de la division cellulaire. L'ADN phagique est alors transféré aux cellules filles (Figure 27). Une transduction effective est basée sur l'état de lysogénie du bactériophage.

Les premiers bactériophages de *O. oeni* sont mis en évidence après centrifugation de vins australiens et observation en microscopie électronique à balayage (Davis et al. 1985). L'étude du potentiel lysogénique des souches de *O. oeni* a montré que 45 à 60% des souches contenaient un prophage après induction à la mitomycine C (Arendt et al. 1991; Poblet-Icart et al. 1998). Santos et al. ont mis en évidence l'intégration du prophage au niveau de deux sites d'attachement présents dans le génome de la souche PSU-1 de *O. oeni* (Santos et al. 1996).

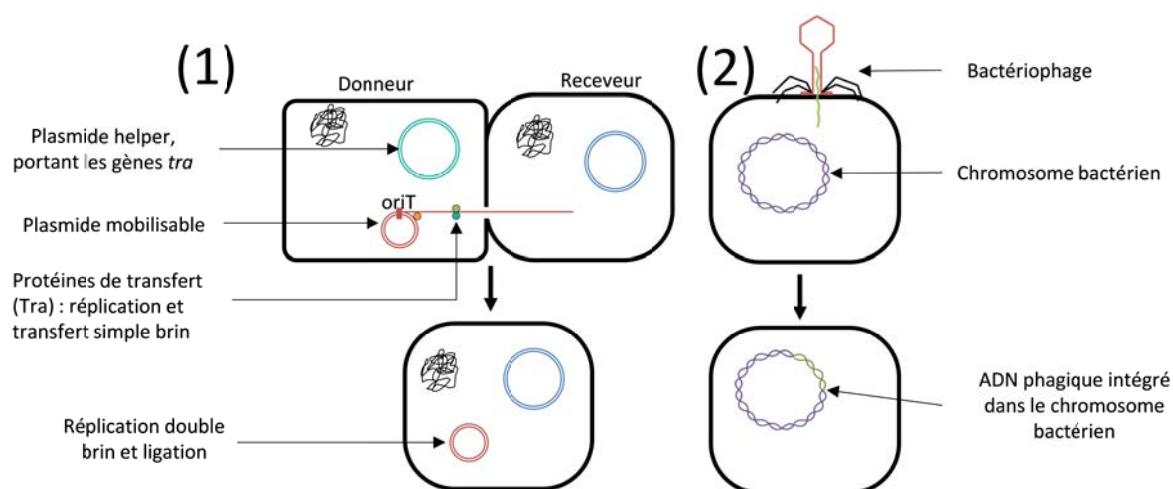


Figure 27 : Les méthodes naturelles de transfert génétique chez *O. oeni* : (1) la conjugaison ; (2) la transduction.

III.1.2. Les transferts artificiels -l'électroporation

L'électroporation est une méthode artificielle de transfert d'ADN basée sur la perméabilisation temporaire de la membrane plasmique par l'application d'un champ électrique. Techniquement, l'application du champ électrique provoque une instabilité des lipides membranaires et donc la formation de nanopores. La membrane reste alors perméable pendant quelques millisecondes et permet l'entrée dans la cellule de macromolécules telles que de l'ADN plasmidique. La mise en œuvre de la technique d'électroporation étant moins fastidieuse que la conjugaison, l'utilisation de cette technique est privilégiée chez de nombreux microorganismes, notamment chez les bactéries à Gram positif. Les nombreux protocoles disponibles préconisent l'utilisation de lavages successifs permettant l'élimination des sels présents dans le milieu de culture et la déstabilisation de l'enveloppe cellulaire. Les cellules devenues compétentes sont ensuite resuspendues dans un tampon dit « d'électroporation » en présence de l'ADN puis sont électroporées. L'utilisation d'un agent déstabilisant la membrane tels que la glycine, le tween 80, la pénicilline (Lu et al. 2014), le sucrose, le glycérol (Teresa Alegre et al. 2004) le lysozyme (Dicks 1994) ou la thréonine (David et al. 1989) ajoutés au milieu de culture ou au tampon de lavage des cellules pour fragiliser l'enveloppe cellulaire, est souvent préconisée afin d'améliorer l'efficacité de transformation.

Un premier phénomène de transformation de *O. oeni* par électroporation utilisant un pré-traitement au lysozyme est décrit par Dicks en 1994. Sur les trois plasmides testés (pGK13, pAMS100 et pIL253), seul le pGK13 est transféré avec succès avec une efficacité de transformation maximale de 1×10^3 cellules par μg d'ADN lorsque les cellules sont prélevées en début de phase exponentielle de croissance. L'état physiologique des cellules semblent influencer l'efficacité de transformation qui restent cependant faible (Dicks 1994). De plus, seul 20% de bactéries survivent à ce protocole d'électroporation. Par la suite, le protocole d'électroporation de *O. oeni* été amélioré par l'ajout d'éthanol jouant le rôle de fluidifiant membranaire dans le tampon d'électroporation. L'efficacité de transformation maximale atteint 5×10^3 cellules par μg d'ADN lorsque les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance et électroporées en présence de 10% d'éthanol (v/v). Avec, l'application de ses paramètres, 10% des cellules survivent. Si l'augmentation du taux d'éthanol utilisé dans le tampon d'électroporation à 15% (v/v) n'affecte ni l'efficacité de transformation ($5,2 \times 10^3$), ni le taux de survie (12%), l'état physiologique des cellules semble avoir son importance. En effet, les cellules en phase

stationnaire semblent mieux supporter l'électroporation avec un taux de survie de 40%. Cependant, l'efficacité de transformation est alors divisée par 10 (Assad-García et al. 2008).

III.2. **Les outils génétiques pour l'analyse fonctionnelle des gènes**

III.2.1. *Les plasmides*

Les plasmides sont des entités largement utilisés comme vecteurs de clonages chez les bactéries, les levures et les cellules humaines. Ce sont des éléments indispensables à la manipulation génétique des microorganismes. Depuis les années 1990, la volonté de construire un vecteur de clonage adapté à *O. oeni* s'est considérablement développée que ce soit par l'étude de l'ADN extra-chromosomique ou par l'élaboration de plasmides à partir d'entités décrites chez d'autres microorganismes. La plupart des plasmides développés chez les bactéries lactiques se répliquent selon un mode simple-brin unidirectionnel appelé réplication en cercle roulant (CR). Cependant, le clonage de grands fragments d'ADN rend instable ces plasmides CR (Pérez-Arellano et al. 2001). Chez les plasmides Thêta, la synthèse des deux brins est simultanée, uni- ou bi-directionnelle et forme un « œil » de réplication visible en microscopie électronique. Ces plasmides Thêta offrent une alternative intéressante de par leur stabilité structurale et ségrégationnelle (Eom et al. 2012).

III.2.1.1. Les plasmides natifs chez *O. oeni*

La présence d'éléments extra-chromosomiques chez *O. oeni* a été mise en évidence pour la première fois il y a presque trente ans par les travaux de Janse et al. (1987). Onze plasmides natifs de 2,47 kpb à 4,61 kpb ont été isolés à partir de huit souches de *O. oeni* issues de vins sud-africains (Janse et al. 1987). Déjà, les auteurs ont remarqué que les plasmides isolés étaient de petites tailles avec une faible fréquence et un faible nombre de copies et soutenaient l'hypothèse véhiculée par Orberg et al. selon laquelle les éléments extra-chromosomique de *O. oeni* contiennent peu d'informations génétiques (Orberg and Sandine 1984; Janse et al. 1987).

La connaissance des plasmides natifs d'une bactérie est une partie intégrante de l'étude fonctionnelle des gènes. En effet, deux plasmides appartenant au même groupe d'incompatibilité ne pouvant coexister, l'obtention de bactéries transformantes ou transconjugantes est en partie dépendante des plasmides natifs de la bactérie réceptrice. Il faut cependant noter que les plasmides cryptiques natifs sont le plus souvent instables et donc que les souches domestiquées

de laboratoire en sont habituellement dénuées. *O. oeni* ATCC BAA-1163, la souche étudiée au laboratoire, porte le plasmide cryptique pRS3 se répliquant selon le mode du cercle roulant (AJ310614.1).

Dans le but de développer des vecteurs de clonage permettant la manipulation génétique de *O. oeni*, la caractérisation de l'ADN extra-chromosomique a reçu une attention considérable aboutissant à la caractérisation de nombreux plasmides cryptiques et de plasmides de grande taille (Fremaux et al. 1993; Brito et al. 1996; Alegre et al. 1999; Brito and Paveia 1999; Brito and Paveia 1999; Mesas et al. 2001; Favier et al. 2012).

III.2.1.1.a. Les plasmides cryptiques

A l'heure actuelle, six petits plasmides cryptiques (de tailles comprises entre 2523 et 3948 bp) ont été mis en évidence et séquencés chez *O. oeni* : pLo13 (Fremaux et al. 1993), p4028 (Zúñiga et al. 1996b), pOg32 (Bruto et al. 1996), pRS1 (Alegre et al. 1999), pRS2, pRS3 (Mesas et al. 2001). Un plasmide cryptique est un plasmide ne contenant que l'information génétique nécessaire à sa réplication et ne donnant aucune propriété nouvelle à la bactérie. Le plasmide p4028 mis à part, l'ensemble des plasmides cryptiques décrits chez *O. oeni* se répliquent *via* un mécanisme de cercle roulant. Ils sont constitués de trois ORFs (ORF1, ORF2 et ORF3) représentés sur la Figure 28. Les deux premiers ORFs (ORF1 et ORF2) codent respectivement la protéine Rep (Replication proteins) et la protéine Pre (Plasmid Recombinant protein) intervenant dans la réplication et la recombinaison du plasmide (Bruto et al. 1996; Zúñiga et al. 1996b; Alegre et al. 1999; Mesas et al. 2001). Le troisième ORF code une protéine dont la fonction est encore inconnue. La présence d'un domaine de type HTH caractéristique des protéines capables de se fixer sur une séquence ADN spécifique et les 49% d'identité avec une protéine Rep de *L. higardii* (WP_003636756.1) suggère que l'ORF3 code également une protéine impliquée dans la réplication et recombinaison du plasmide.

Ces plasmides ont également en commun la présence de séquences d'ADN requises pour la réplication en mode cercle roulant (CR), une répétition de thymine (CTTTTTTT(T)) séparant le site de fixation du ribosome (RBS : Ribosome Binding Site) et le codon initiateur ATG de l'ORF1, des sites spécifiques de recombinaisons RS_A et RS_B et une origine double brin (DSO : double-strand origin) (Alegre et al. 1999; Mesas et al. 2001). Les motifs communs décrits ci-dessus sont représentés dans la Figure 28 avec l'exemple du pRS2. Les travaux de Mesas et de

restent difficiles à détecter probablement à cause de leur faible nombre de copies ou à un curage rapide (Brito and Paveia 1999).

Deux grands plasmides, pOENI-1 et son dérivé pOENI-1v2 portant des gènes possiblement impliqués dans l'adaptation au milieu vin ont également été isolés à partir de 44 souches de *O. oeni* (Tableau 5) (Favier et al. 2012). Le pOENI-1 est le premier plasmide décrit chez *O. oeni* ayant un mode de répllication Thêta. Il possède les gènes communs à la répllication et peut contenir, de manière souche-dépendante, deux gènes impliqués dans l'adaptation en vin: *tauE* codant un transporteur de sulfite et *oye* une flavine NADH oxydoréductase (Figure 29) (Favier et al. 2012). La séquence nucléotidique de ces deux plasmides possèdent 99% d'identité et ne diffèrent que d'un fragment de 3,5 kpb présent uniquement dans le pOENI-1v2.

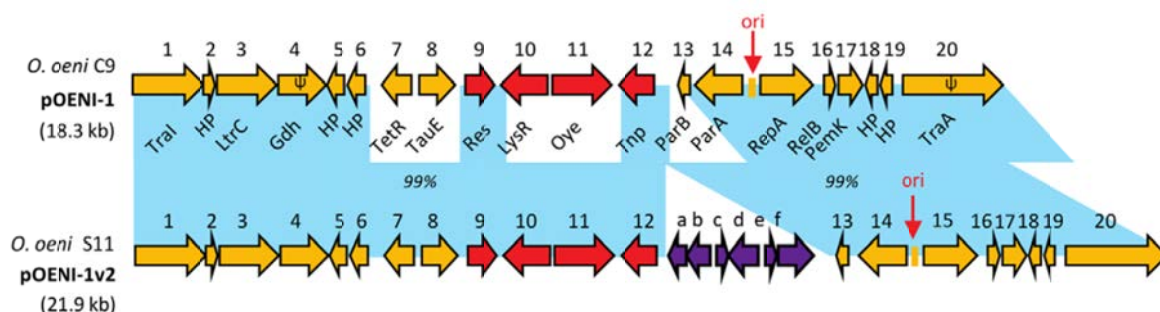


Figure 29 : Organisation génétique de pOENI-1 et de son dérivé pOENI-1v2 (Favier et al. 2012). Les ORFs sont représentées par des flèches numérotées. L'origine de répllication du plasmide est indiquée par une flèche rouge verticale.

Malgré de nombreuses études menées sur l'ADN extra-chromosomique et plus particulièrement sur les plasmides cryptiques de *O. oeni* utilisant un mode de répllication en cercle roulant, aucun vecteur de clonage n'est actuellement disponible avec des signaux de transcription adaptés à *O. oeni*. Les grands plasmides utilisant un mode de répllication CR ont reçu une attention considérable depuis le début des années 2010 (Mesas et al. 2011; Favier et al. 2012; Rodríguez et al. 2015). Les plasmides à répllication Thêta sont généralement plus stables d'un point de vue structurale et permettent d'envisager le clonage de grands fragments d'ADN contrairement aux plasmides se répliquant selon le mode CR décrits comme moins stables (Gruss and Ehrlich 1989). Récemment, les travaux Rodriguez et al. ont abouti à la création d'un vecteur chimérique de clonage, le pRS7Rep (Figure 30), construit à partir de la région répllicative du pRS7, un grand plasmide isolé à partir de la souche indigène *O. oeni* CT86 (Tableau 5) (Mesas et al. 2011). Le pRS7Rep (6,1 kpb) est un vecteur navette capable de se répliquer chez *E. coli* grâce à une partie

du pIJ2925 et chez les bactéries lactiques grâce à la région répliquative du pRS7 (Figure 30). Cependant, malgré l'affirmation des auteurs selon laquelle le pRS7Rep constitue le premier vecteur utilisant une origine de répliquaison de *O. oeni* pouvant être utilisé comme un vecteur de clonage chez cette bactérie lactique, aucun essai de transfert n'est à ce jour publié.

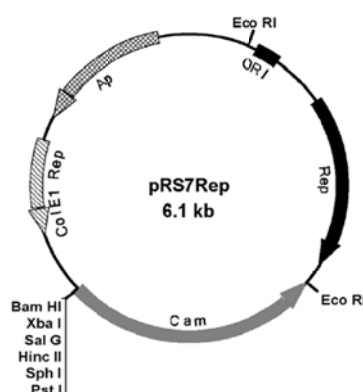


Figure 30 : carte du plasmide chimérique pRS7Rep : vecteur navette Gram⁺ dérivé du pRS7, du pIJ2925 et du pEM64. Fragment EcoRI (ORI et Rep, en noir) issue du pRS7 qui contient la région répliquative permettant la répliquaison chez les bactéries lactiques. Région EcoRI- BamHI (Cam, en gris) issue du pEM64 contient le gène de résistance au chloramphénicol. Régions BamHI-EcoRI du pIJ2925 qui contiennent la région répliquative du pUC18 (ColEI Rep, hachurée) et le gène de résistance à l'ampicilline (Ap, quadrillée).

III.2.1.2. Les plasmides de clonages

III.2.1.2.a. Le pGID052

Actuellement, nous disposons d'un nombre restreint d'outils moléculaires nécessaires à l'exploration fonctionnelle de *O. oeni*. Le pGID052 reste à ce jour l'unique vecteur disponible permettant un transfert génétique par conjugaison ou par électroporation chez *O. oeni* (Beltramo et al. 2004b). Le vecteur pGID052 est un vecteur navette Gram⁺ de 5,7 kpb dérivant du pGID701 (Figure 31). Le pGID701 dérive lui-même du pORI19 dans lequel a été cloné l'origine de transfert du pIP501, il est non répliquatif chez les bactéries à Gram⁺ (Oraby 2002). Une région nécessaire à la répliquaison (*pORFx*, *RepA*, *RepB*) mesurant 3,38 kpb issue du vecteur pLC22R de *Leuconostoc citreum* a ensuite été clonée dans le pGID701 formant ainsi le pGID052. Toutefois, la construction du pGID052 a entraîné la perte du criblage blanc-bleu via l'interruption du fragment *lacZ'* et la duplication de site de restriction limitant les stratégies de clonage. De plus, ce vecteur présente une taille conséquente (5,7 kpb). Spécialement conçu pour le transfert génétique chez *O. oeni*, ce vecteur est stable à la ségrégation durant 100 générations et a été utilisé pour l'expression du gène *clpL2* de *O. oeni* dont l'extrémité 3' a été tronquée (*clpL2'*) afin de pouvoir distinguer le produit d'expression de ce gène de la protéine ClpL2 native.

L'expression du gène *clpL2* placé sous le contrôle de son propre promoteur a permis la synthèse *in vivo* d'une protéine ClpL2 tronquée de ses 346 résidus carboxy-terminaux et détectable par immuno-détection (Assad-García et al. 2008). Ce plasmide constitue une avancée majeure pour l'expression de gènes chez *O. oeni*. Cependant, le pGID052 nécessite d'être optimisé en particulier en ce qui concerne sa taille, l'absence de signaux d'expression et de criblage des plasmides recombinants.

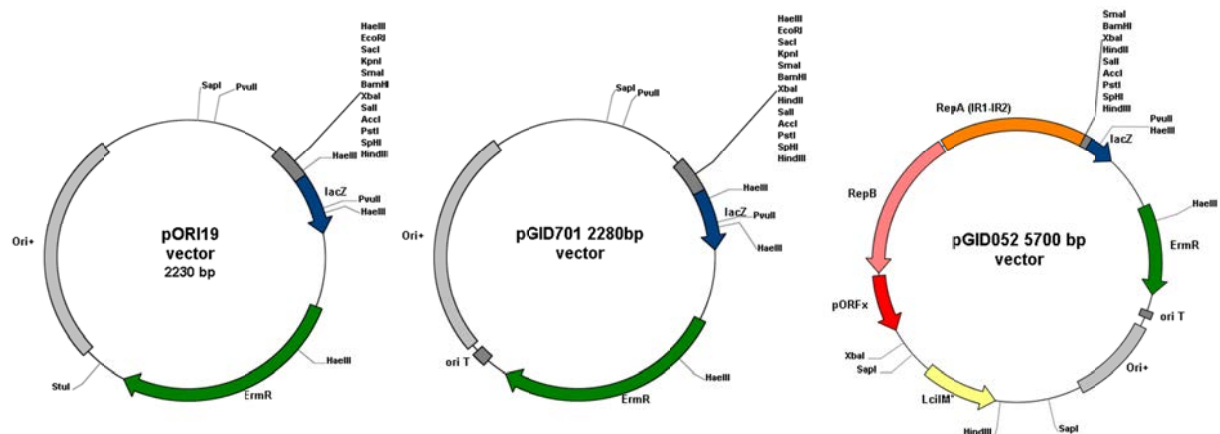


Figure 31 : Cartes des vecteurs pORI19, pGID701 et de son dérivé pGID052 : (1) pORI19 : vecteur dérivé du pWV01, gène de résistance à l'érythromycine (Em^R) et origine de réplication Gram⁻ (ori^+) issus du pWV01. *repA*, criblage blanc-bleu en présence de X-Gal avec le gène de la β -galactosidase (*lacZ*) et site multiple de clonage issus du pUC19. Vecteur répliquatif chez *E. coli* et intégratif chez les bactéries lactiques (Law et al. 1995a) ; (2) pGID701 : vecteur dérivé de pORI19, origine de transfert ($oriT$) du pIP501 (Zúñiga et al. 2003) ; (3) pGID052 : vecteur navette Gram⁺/– dérivé de pGID701, origine de réplication Gram⁺ issue du pLC22R (*RepA*, *RepB*, *pORF*, *Lcilm'*), répliquatif chez les bactéries lactiques, sélection des bactéries à l'érythromycine et lincomycine (*ermL*) (Oraby 2002; Beltramo et al. 2004b).

D'autres vecteurs ont été transférés et testés chez *O. oeni*, tels que le pIP501 ou le pVA797, mais le pGID052 est le seul vecteur stable à la ségrégation et pour lequel l'expression d'un gène a été reporté chez *O. oeni* (Zúñiga et al. 2003; Beltramo et al. 2004b; Assad-García et al. 2008). En effet, le vecteur conjugatif pIP501 et son dérivé, instables à la ségrégation, subissaient de larges délétions spécifiques lors de leur transfert de *L. lactis* à *O. oeni* (Zúñiga et al. 2003).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des principaux plasmides, bactériophages et vecteurs décrits chez *O. oeni*

Noms (N° d'accèsion)	Tailles	Modes de répllication ¹	Caractéristiques connues ²	Références
Plasmides cryptiques				
pLo13	3948 bp	CR	Isolé de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163	(Fremaux et al. 1993)
pOg32	2544 bp	CR	Isolé d'une souche issue d'un vin portugais	(Brito et al. 1996)
P4028	4410 bp	Inconnue	inconnue	(Zúñiga et al. 1996b)
pRS1	2523 bp	CR	Isolé d'une souche issue d'un vin espagnol	(Alegre et al. 1999)
pRS2 (AJ310613)	2544 bp	CR	Isolé d'une souche issue d'un vin espagnol	(Mesas et al. 2001)
pRS3 (AJ310614)	3948 bp	CR	Isolé d'une souche issue d'un vin espagnol	(Mesas et al. 2001)
Grands plasmides				
pOg25	37 kpb	inconnue	Isolé d'une souche issue d'un vin portugais	(Brito and Paveia 1999)
pOENI-1 (JX416328)	18.3 kpb	Mode Thêta	Isolé de ferments malolactiques et de souches de laboratoire	(Favier et al. 2012)
pOENI-1v2 (JX416329)	21.9 kpb			
pRS7	~20 kpb	Mode Thêta supposée	Isolé d'une souche de <i>O. oeni</i> CT86 issu d'un vin espagnol	(Mesas et al. 2011)
Vecteurs				
pGID052	5,7 kpb	Mode thêta	Tet ^R , Cm ^R , Em ^R , Lm ^R , Pl ^R , plasmide R issu de <i>Streptococcus agalactiae</i> de groupe B	(Beltramo et al. 2004b)
pIP501	30,3 kpb	Mode thêta mais région CR fonctionnelle	EmR/LmR, fragment d'ADN HindIII de 3,38 kpb de pLC22R, <i>oriR</i> of pLC22R	(Le Chatelier et al. 1993; Pujol et al. 1998; Zúñiga et al. 2003)
Œnophages				
Noms	Groupe Int	Caractéristiques	Références	
L10	inconnue	Identification de onze ORFs dont cinq gènes et séquences régulatrices	(Sutherland et al. 1994)	
φ10MC	Int _B	Phage tempéré, gènes <i>int</i> en amont du site <i>attP</i> + gènes <i>hol</i> et <i>lys</i> au sein du site <i>attP</i>	(Gindreau and Lonvaud-Funel 1999)	
fOg44	Int _A	Groupe β, gène <i>lys</i> inhibé par un élément <i>cis</i> -régulateur	(Santos et al. 1998; Parreira et al. 1999; São-José et al. 2000; Nascimento et al. 2008)	

¹ CR : mode répllication en cercle roulant ; ² Tet^R : résistance à la tétracycline ; Cm^R : au chloramphénicol, Em^R à l'érythromycine, Lm^R à la lincomycine et Pl^R au pristnamycine.

III.2.1.2.b. Le pSIP409 et ses dérivés

Durant ces trente dernières années, la caractérisation de l'ADN extra-chromosomique et la mise au point d'outils génétiques ont reçu une attention particulière chez *O. oeni*. Cependant, un vecteur d'expression avec des signaux de transcription efficace est toujours manquant et la mutagenèse dirigée n'est pas encore envisageable.

Chez *O. oeni*, le besoin d'un nouvel outil d'expression comportant des signaux de transcription adaptés suivi d'un gène rapporteur facilitant l'étape de criblage des bactéries transformantes se fait réellement ressentir. Chez les bactéries lactiques, de nouvelles générations de vecteurs d'expression sont régulièrement mis au point. Ces systèmes d'expressions qualifiés de « *Food-grade* » (qualité alimentaire) ou « *GRAS* » ont été mis au point dans un but de stratégie d'autoclonage utilisant des marqueurs de sélection de qualité alimentaire afin de pouvoir être utilisés lors de l'élaboration de produits alimentaires. En effet, si l'ajout d'enzymes recombinantes est généralement empêché par un contexte socio-culturel, l'utilisation de bactéries lactiques avec ces systèmes « *Food-grade* » est davantage tolérée par les consommateurs. Initié chez *L. casei*, l'un des premiers systèmes « *Food-grade* » utilisait l'opéron lactose pour l'expression du gène *ilvBN* de *L. lactis* codant une acide hydroxyacétique synthase impliquée dans la synthèse d'acides aminés branchés précurseurs du diacétyl dans le but d'une application dans des processus fermentaire des yaourts (Gosalbes et al. 2000). Dans le même but d'améliorer la qualité organoleptique des produits fermentaires, le système NICE (NISine Controlled gene Expression) a été largement mis à contribution pour la production d'enzymes d'intérêt biotechnologique (β -galactosidase, aminopeptidase, aminoacylase, lipase) sous le contrôle du promoteur inductible à la nisine P_{nisA} (Mierau et al. 2005; Maischberger et al. 2010; Peterbauer et al. 2011).

Plus récemment, une nouvelle famille de vecteur d'expression inductible a fait son apparition chez les bactéries lactiques et plus particulièrement *L. plantarum* : la série des pSIP. Le pSIP409, principal vecteur de cette famille est un vecteur navette Gram^{+/} développé pour les bactéries lactiques, et possède une cassette de résistance à l'érythromycine de la même famille que le pGID052 et un système d'expression inductible « *Food-grade* » (Axelsson et al. 1988; Sørvig et al. 2003; Beltramo et al. 2004b). Le système d'expression inductible est dérivé du cluster de gènes *spp* impliqué dans la production de la sakacine P, une bactériocine de classe II libérée par

L. sakei. Comme le système NICE, ce système à deux composants de type senseur-régulateur, codé par le cluster de gènes *spp*, est activé par l'ajout d'un peptide phéromone de 19 acides aminés (MAGNSSNFIHKIKQIFTHR) (Hühne et al. 1996). Le peptide active le promoteur P_{SppIP} qui initie la transcription de la phosphokinase SppK et du régulateur SppR. La protéine SppK active par phosphorylation SppR qui induit à son tour l'expression du gène *gusA*. Le gène *gusA* code une β -glucuronidase capable d'hydrolyser le X- gluc (Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronique) libérant un précipité bleu ce qui permet un criblage phénotypique sur milieu gélosé. L'efficacité des deux systèmes d'expression, NICE et pSIP, a été comparé quant à leur capacité à produire de l'acide 2,5dicéto-gluconique réductase issue de *Corynebacterium glutamicum*. Dans les deux cas, les systèmes sont efficaces et produisent une grande quantité d'enzyme. Cependant, le rendement maximal de production de l'enzyme est atteint grâce au vecteur pSIP409 avec 262 U.l⁻¹ de milieu contre 114 U.l⁻¹ de milieu pour le vecteur pNZ8150 (Kaswurm et al. 2013).

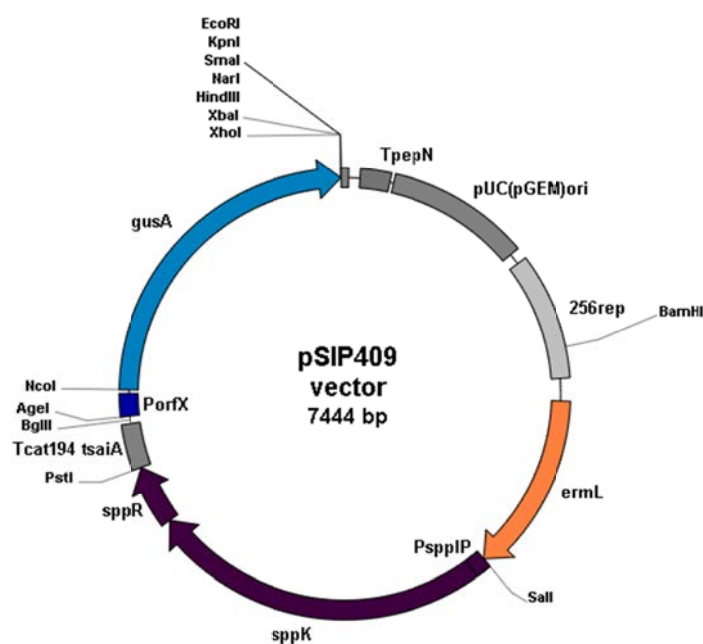


Figure 32 : Carte du vecteur pSIP409 : vecteur navette Gram^{+/−}, origine de réplication Gram[−] (pUC(GEM)ori), origine de réplication Gram⁺ (256rep), sélection à l'érythromycine (*ermL*), expression du gène rapporteur *gusA* codant la β -glucuronidase inducible par SppIP. Le système d'expression est inducible par un peptide phéromone (SppIP) de 19 acides aminés (MAGNSSNFIHKIKQIFTHR) dérivé du système de production des bactériocines Sakacine P et codé par le cluster des gènes *sppKR*. L'ajout de SppIP active le promoteur P_{SppIP} qui initie la transcription des gènes *sppK* et *sppR*. SppK et du régulateur SppR. SppK active par phosphorylation SppR qui va pouvoir activer le promoteur P_{ORF_x} (promoteur d'un ORF inconnu du régulon de la sakacin P) qui induit à son tour l'expression du gène *gusA*. Criblage blanc-bleu par ajout d'un substrat synthétique de la β -glucuronidase, le X-gluc (5Bromo4chloro3indolyl glucuronide → précipité bleu avec hydrolyse p-nitrophényl- β -D-Glucuronide).

III.2.2. Les œnophages

Comme renseigné précédemment dans le paragraphe III.1.1.b, les bactériophages ont été décrits pour la première fois en 1985 par Davis et al. Potentiellement responsables du retard ou de l'arrêt prématuré de la fermentation malolactique, ils ont reçu une attention considérable durant ces trente dernières années (Davis et al. 1985; Arendt et al. 1991; Sutherland et al. 1994; Santos et al. 1996; Gindreau et al. 1997; Santos et al. 1998; Poblet-Icart et al. 1998; Parreira et al. 1999; Gindreau and Lonvaud-Funel 1999; São-José et al. 2000; São-José et al. 2004; Nascimento et al. 2008; Doria et al. 2013; Jaomanjaka et al. 2013). Ces études ont abouti à la caractérisation approfondie de huit œnophages : ϕ 10MC (Gindreau et al. 1997; Gindreau and Lonvaud-Funel 1999), L10 (Sutherland et al. 1994), fOgML34, fOg4029, fOg30, fOg218, fOg44 et fOgPSU1 (Santos et al. 1998) classés dans quatre groupes différents (int_A , int_B , int_C , int_D) basés sur les similarités de séquence du gène *int* de l'intégrase (Tableau 5) (Santos et al. 1998; Jaomanjaka et al. 2013). Les œnophages ont en commun une tête isométrique et une longue queue striée (Figure 33). Ils sont maintenant facilement détectables par une technique de RAPD (Randomly Amplified polymorphic DNA) basée sur la détection par amplification aléatoire par PCR du gène codant l'endolysine (*lys*) hautement conservée dans le génome des œnophages (Doria et al. 2013). Quatre sites d'attachement permettant **l'intégration du prophage** ont été identifiés dans le génome de la souche PSU-1 suggérant une **utilisation possible des œnophages comme des vecteurs de clonages** et laissant **espérer une intégration d'ADN exogène chez *O. oeni***.

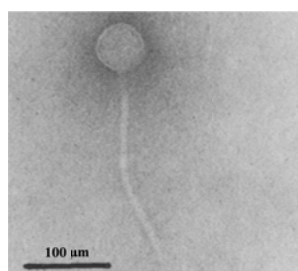


Figure 33 : Bactériophage de *O. oeni* observé au microscope électronique à balayage (Davis et al. 1985)

III.3. **Alternative à la mutagenèse dirigée : inhibition séquence spécifique par production d'ARN antisens.**

Comme l'exposent les deux précédents paragraphes, la caractérisation de l'ADN chromosomique et l'élaboration de techniques de transformation chez *O. oeni* ont reçu une attention considérable durant ces trente dernières années. La manipulation génétique de *O. oeni* représente une thématique à part entière du laboratoire et plusieurs travaux de thèse lui ont été consacrée (Oraby

2002; Beltramo 2004; Assad-García et al. 2008; Bonnin-Jusserand 2011). Les méthodes de transformation génétique ne permettent pas encore d'envisager la construction d'un mutant par double recombinaison. En effet, l'efficacité de transformation de $5,8 \times 10^3$ cellules transformantes par μg d'ADN plasmidique reste inférieure à la fréquence d'un événement de recombinaison (Dicks 1994; Assad-García et al. 2008). L'exploration fonctionnelle par système d'expression hétérologue constitue jusqu'à présent l'alternative privilégiée à la mutagenèse dirigée et a permis d'amorcer la caractérisation des gènes *hsp18*, *ctsR*, *cfa*, *mleA*, *odc*, *estA2*, *estB* et *estC* (Jobin et al. 1997; Grandvalet et al. 2005; Sumby et al. 2009; Bonnin-Jusserand et al. 2011; Sumby et al. 2012a; Schümann et al. 2012; Schümann et al. 2013). Cependant cette technique reste limitée et ne permet pas une étude *in vivo* approfondie en milieu vin.

Une nouvelle technique a récemment fait son apparition comme une alternative à la mutagenèse dirigée et au système d'expression hétérologue pour l'analyse fonctionnelle des gènes : **le ciblage par ARN antisens** (ARNas). Cette technique, désignée par différents termes tels que le « Gene silencing » ou le « Knock Down », permet un ciblage séquence spécifique de gènes par expression d'ARNas permettant de moduler l'expression de ces gènes cibles. Les ARNas sont alors définis comme des « polymères synthétiques ou naturels qui reconnaissent et inhibent spécifiquement l'expression de l'ARN messager (ARNm) sens ciblé » (Good 2003). Divers mécanismes antisens existent et désignent tous les mécanismes basés sur la reconnaissance spécifique de l'ARNm menant à la réduction ou à l'altération de l'expression du transcrit ou de l'ARN sens (Rasmussen et al. 2007).

Le ciblage par antisens est un phénomène commun dans la nature et peut affecter la transcription en induisant la dégradation de l'ARNm ou la répression de la traduction. Basée sur le principe d'appariement des bases de l'ARNas avec sa cible, cette technique correspond à une régulation post-transcriptionnelle permettant d'empêcher la synthèse des protéines par inhibition de la traduction sans modification de la séquence cible chromosomique de la bactérie. Cette stratégie, contrairement à l'interruption de gène, convient à la modulation de l'expression de gènes essentiels à la survie de la bactérie. L'expression d'un ARNas étant exactement complémentaire de l'ARNm cible constitue la forme la plus basique de la technique. Plusieurs stratégies de ciblage peuvent être envisagées pour parvenir à moduler l'expression de gènes. Les ARN antisens exprimés peuvent cibler l'ensemble de la phase de lecture du gène (ORF : *open reading*

frame) (McGrath et al. 2001; Bouazzaoui and LaPointe 2006; Croxen et al. 2007; Oddone et al. 2009), le site de liaison au ribosome (RBS : *Ribosome Binding Site*) ou une séquence à proximité du RBS (Engdahl et al. 1997; Engdahl et al. 2001; Good 2003). La formation du duplex ARNm-ARNas a deux conséquences : (i) le blocage de la traduction par encombrement stérique inhibant la fixation du ribosome sur son RBS et (ii) la dégradation de l'ARN double brin par des RNAses (Rasmussen et al. 2007).

Chez les bactéries lactiques, le ciblage de l'ORF complet par ARNas est, jusqu'à présent, la stratégie privilégiée et a montré qu'une inhibition par appariement des bases était possible. Ainsi Baouazzaoui et al. parviennent à modifier la production d'exopolysaccharides chez *L. rhamnosus* en ciblant le gène *welE* d'une glycosyltransférase par des ARNas recouvrant l'intégralité de l'ORF (Bouazzaoui and LaPointe 2006). Chez *L. lactis*, la même stratégie a permis d'empêcher la prolifération de quatre phages (McGrath et al. 2001). Plus récemment, Oddone et al. ont adapté le système NICE pour l'expression des ARNas ciblant l'intégralité de l'ORF du gène *clpP* de *L. lactis* (Oddone et al. 2009). Dans toutes ces études, les ARNas sont produits par l'intermédiaire de vecteurs réplcatifs permettant une expression inductible ou non des ARN antisens et aucune modification du chromosome n'a lieu, ce qui fait de cette technique, une alternative à la mutagenèse, séduisante pour l'exploration fonctionnelle des gènes chez *O. oeni*.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce projet thèse était d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu par *O. oeni* en réponse aux changements de conditions environnementales. Pour caractériser l'activité de CtsR, l'unique chef d'orchestre de la réponse au stress connu et identifié chez *O. oeni*, il paraît indispensable de comprendre quel(s) mécanisme(s) parvient(nent) à réguler son activité alors que le génome de *O. oeni* ne comporte ni les acteurs décrits chez *B. subtilis* (*mcsA*, et *mcsB*), ni *clpE* requis pour l'activité répressive de CtsR chez *L. lactis*.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient les suivants :

I. **Développement d'un outil moléculaire : approche *in vivo* de la fonction de *hsp18*.**

Une partie de ma thèse a été consacré au **développement d'un outil d'expression**. Le vecteur obtenu, nommé pSIPSYN, a été utilisé pour l'**élaboration de la technique de ciblage par ARNas**. Pour tester la fonctionnalité de cette technique, nous avons ciblé le gène *hsp18*. Ce choix s'est essentiellement imposé pour des raisons techniques. En effet, ce gène de petite taille code la protéine Lo18 particulièrement étudiée au laboratoire et nous disposons d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette sHsp. Deux vecteurs différents ont été construits : (i) l'un permettant la synthèse d'ARNas ciblant l'intégralité de la phase codante et l'autre ciblant la région 5'UTR du gène *hsp18*. Les deux techniques de ciblage ont été comparées en évaluant le taux protéiques de Lo18 détectés dans les deux souches recombinantes de *O. oeni*. L'étude phénotypique de la souche recombinante présentant une diminution drastique du taux de Lo18 intracellulaire nous a permis d'**étudier le rôle de ce chaperon moléculaire en conditions de stress thermique, acide ou éthanolique**. L'implication de Lo18 dans le recouvrement de la fluidité membranaire après un choc éthanolique a également été évaluée par la technique d'anisotropie de fluorescence.

II. **Caractériser la fonction du répresseur CtsR et les mécanismes de régulation de son activité chez *O. oeni*.**

Dans un premier temps, les mécanismes de régulation de l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR de *O. oeni* ont été étudiés en **système d'expression hétérologue** utilisant *B. subtilis* comme bactérie hôte. Un système d'expression hétérologue inductible au xylose a été associé à un

système rapporteur utilisant le gène *bgaB* de *G. stearothermophilus* en fusion transcriptionnelle avec le promoteur de *hsp18* portant le site opérateur de CtsR.

Dans un deuxième temps, **la fonction du régulateur transcriptionnel CtsR** a été étudiée *in vivo* chez *O. oeni*. La technique de ciblage par synthèse d'ARNas exposée précédemment avec le gène *hsp18* a été appliquée au gène *ctsR*. La caractérisation de la fonction de CtsR chez *O. oeni* a été initiée par une étude phénotypique lors de stress de différentes natures (thermique et acide) de la souche recombinante synthétisant des ARNas ciblant la phase codante de *ctsR*.

III. Etudier l'impact des gènes d'estérases de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin après FML.

Le vecteur pSIPSYN mis au point au cours de ces travaux de thèse a été valorisé par une application œnologique. A l'aide de cet outil, nous avons pu étudier **l'impact des estérases de *O. oeni* sur le profil aromatique d'un vin Aligoté ayant préalablement subi l'étape de FA.** Pour ce faire, les deux gènes d'estérases de *O. oeni*, *estA2* et *estA7*, ont été clonés dans le vecteur d'expression pSIPSYN. Les vecteurs résultants ont ensuite été transférés chez *O. oeni* et les souches recombinantes obtenues ont été utilisées pour ensemençer un vin Aligoté. L'état d'avancement de la FML a été évalué par le biais d'un dosage de la concentration en acide malique dans les vins expérimentaux. La concentration des principaux esters présents après FML (acétate d'éthyle, acétate d'isobutyle, butanoate d'éthyle, acétate d'isoamyle, hexanoate d'éthyle, acétate d'hexyle, lactate d'éthyle et octanoate d'éthyle) a été évaluée par une technique de microextraction sur phase solide (SPME) couplée à une analyse en chromatographie gazeuse et une spectrométrie de masse (GC/MS) dans les vins expérimentaux obtenus.

Résultats

I. Etude de la réponse au stress chez *O. oeni*

L'étude de la réponse au stress chez *O. oeni* réalisée au cours de ce travail de thèse est divisée en deux parties : (i) une 1^{ère} partie porte sur l'étude *in vivo* de la fonctionnalité du gène *hsp18* codant l'unique **sHsp** de *O. oeni* : Lo18 ; (ii) une 2^{nde} partie aborde la caractérisation du répresseur transcriptionnel **CtsR**, l'unique régulateur de la réponse au stress décrit à l'heure actuelle chez *O. oeni*. Une discussion abordant conjointement ces deux parties est présentée dans la partie I de la Discussion-Perspectives.

I.1. Etude du chaperon moléculaire Lo18 et de son rôle *in vivo*

I.1.1. Introduction

Le gène *hsp18* de *O. oeni* appartient au régulon CtsR. Ce gène code la protéine Lo18, unique représentant de la famille des sHsp chez cette bactérie lactique. Les sHsps sont des protéines cytoplasmiques de faibles masses moléculaires présentant une activité de chaperon moléculaire. Certaines sHsp, dont Lo18, ont été associées à une activité lipochaperon membranaire. La caractérisation de Lo18 a fait l'objet de nombreuses études menées au laboratoire tant *in vitro* (Delmas et al. 2001; Coucheney et al. 2005; Maitre et al. 2012; Maitre et al. 2014), que par l'intermédiaire de système d'expression hétérologue chez *E. coli* ou *B. subtilis* (Morel et al. 2001; Delmas et al. 2001; Grandvalet et al. 2005; Weidmann et al. 2010; Ronez et al. 2012). Cependant l'exploration fonctionnelle par le biais de systèmes d'expression hétérologue reste limitée et ne permet pas une étude approfondie *in vivo* en conditions œnologiques. La délétion du gène *hsp18* par mutagenèse permettrait d'évaluer la fonctionnalité *in situ* de ce gène. Faute de stratégie expérimentale efficace elle n'est pas envisageable à l'heure actuelle.

Afin d'évaluer l'implication de Lo18 dans les capacités d'adaptations de *O. oeni* lors de changements de conditions environnementales, nous avons donc contourné les obstacles liés à la construction de mutant chez *O. oeni* par le développement d'une approche alternative originale ne nécessitant pas la modification de l'ADN chromosomique : l'inhibition séquence spécifique par production d'ARN antisens ciblant le messager du gène *hsp18* ou la région 5'UTR du gène.

Nous avons tout d'abord développé un vecteur d'expression fonctionnel chez *O. oeni*. Au début de cette étude, nous disposions d'un nombre restreint d'outils moléculaires. Le pGID052 constituait l'unique vecteur disponible permettant un transfert génétique par conjugaison ou par

électroporation chez *O. oeni* (Beltramo et al. 2004b). Cependant, l'utilisation de ce vecteur s'avère limitée de par l'absence de signaux d'expression et de marqueur de sélection facilitant la ségrégation des plasmides recombinants. Le vecteur navette *E. coli*/bactéries lactiques, pSIP409, récemment développé par l'équipe du Pr. Lars Axelsson (Nofima – Norwegian Institute for Food, Fisheries and Aquaculture Research, Ås, Norway) a été transféré avec succès chez *O. oeni* et s'est révélé stable. Néanmoins le système d'expression inductible par ajout d'un peptide inducteur fusionné au gène rapporteur *gusA* codant une β -glucuronidase ne semblait pas fonctionner chez *O. oeni*. En effet, l'utilisation du substrat synthétique de l'enzyme associé à un chromophore, le X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronique présentant une coloration bleue après hydrolyse de la β -glucuronidase) n'a pas permis de visualiser sur milieu gélosé l'activité de l'enzyme après ajout du peptide inducteur. Nous avons donc supprimé ce système d'expression inductible basée sur l'opéron *spp* de la sakacine P que nous avons remplacé par des signaux d'expression consensus. Basée sur la séquence consensus issue de l'alignement de régions promotrices caractérisées de divers gènes de *O. oeni*, une séquence promotrice a été synthétisée, P_{SYN}, et clonée en lieu et place du promoteur inductible du pSIP409. Le vecteur obtenu, nommé pSIPSYN, a été utilisé pour la production des ARNas ciblant le messager de *hsp18*.

Pour moduler l'expression de *hsp18* chez *O. oeni*, nous avons mis en place deux stratégies de ciblage : l'une portant sur la totalité de la phase codante du gène et l'autre ciblant la région 5'UTR du gène. Cette technique nous a permis pour la première fois chez cette bactérie d'étudier *in vivo* la fonction du gène *hsp18*. Le ciblage de la totalité de la phase codante a entraîné une diminution du taux protéique de Lo18 de 50% tandis que le ciblage de la région 5'UTR n'a eu aucun effet sur le taux de protéine. Nous avons donc poursuivi l'étude par la caractérisation du phénotype de la souche recombinante affectée dans la synthèse de Lo18. La diminution du taux protéique de Lo18 a induit une perte significative de cultivabilité de 95% après un choc thermique (48°C) et de 98% après un choc acide (pH3) ce qui démontre pour la première fois *in vivo* l'implication de Lo18 dans la thermotolérance et l'acidotolérance de *O. oeni* et suggère un rôle de chaperon moléculaire effectif. La forte mortalité observée traduit un rôle essentiel de Lo18 suggérant que l'interruption pourrait ne pas être viable.

L'interaction de Lo18 avec les lipides membranaires ayant été mise en évidence lors de travaux précédents, la technique d'anisotropie de fluorescence a été utilisée afin d'évaluer les conséquences d'une diminution du taux de cette protéine sur le maintien de l'intégrité membranaire lors d'un stress éthanol. Les résultats obtenus ont montré que la restauration de la fluidité membranaire de la cellule était fortement affectée suite au stress en présence d'ARNas.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une communication affichée lors du congrès internationale FEMS 2015 (Maastricht, Pays-Bas, 7 au 11 juin 2015) et a été accepté en octobre 2015 par le journal AEM sous le titre « **The antisense RNA approach: a new application for *in vivo* stress response investigation in *Oenococcus oeni*** » 2015, oct 9 (sous presse).

I.1.2. Article I

Title: “The antisense RNA approach: a new application for *in vivo* stress response investigation in *Oenococcus oeni*”

Short title: Use of antisense RNA in *Oenococcus oeni* to modulate *hsp18* gene expression

Authors: ¹M. Darsonval, ³T. Msadek, ¹H. Alexandre, ^{1,2}C. Grandvalet.

¹UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress(VAlMiS), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France,

²AgroSup Dijon, Institut national supérieur des sciences agronomiques, de l'alimentation et de l'environnement, Dijon – France,

³Unité de biologie des bactéries pathogènes à Gram positif, Institut Pasteur, Paris– France.

Key-words: *O. oeni*, antisense RNA, stress response, *hsp18*.

Corresponding author: Cosette Grandvalet, Université de Bourgogne – IUVV Jules Guyot, Equipe VAlMiS, 1, rue Claude Ladrey - Campus Montmuzard, B.P.27877 - 21078 Dijon, France, e-mail: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr, 03-80-39-62-66.



The Antisense RNA Approach: a New Application for *In Vivo* Investigation of the Stress Response of *Oenococcus oeni*, a Wine-Associated Lactic Acid Bacterium

Maud Darsonval,^a Tarek Msadek,^{c,d} Hervé Alexandre,^a Cosette Grandvalet^{a,b}

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress, AgroSup Dijon-Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France^a; AgroSup Dijon, Institut National Supérieur des Sciences Agronomiques, de l'Alimentation et de l'Environnement, Dijon, France^b; Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram Positif, Institut Pasteur, Paris, France^c; CNRS ERL 3526, Paris, France^d

Oenococcus oeni is a wine-associated lactic acid bacterium mostly responsible for malolactic fermentation in wine. In wine, *O. oeni* grows in an environment hostile to bacterial growth (low pH, low temperature, and ethanol) that induces stress response mechanisms. To survive, *O. oeni* is known to set up transitional stress response mechanisms through the synthesis of heat stress proteins (HSPs) encoded by the *hsp* genes, notably a unique small HSP named Lo18. Despite the availability of the genome sequence, characterization of *O. oeni* genes is limited, and little is known about the *in vivo* role of Lo18. Due to the lack of genetic tools for *O. oeni*, an efficient expression vector in *O. oeni* is still lacking, and deletion or inactivation of the *hsp18* gene is not presently practicable. As an alternative approach, with the goal of understanding the biological function of the *O. oeni hsp18* gene *in vivo*, we have developed an expression vector to produce antisense RNA targeting of *hsp18* mRNA. Recombinant strains were exposed to multiple stresses inducing *hsp18* gene expression: heat shock and acid shock. We showed that antisense attenuation of *hsp18* affects *O. oeni* survival under stress conditions. These results confirm the involvement of Lo18 in heat and acid tolerance of *O. oeni*. Results of anisotropy experiments also confirm a membrane-protective role for Lo18, as previous observations had already suggested. This study describes a new, efficient tool to demonstrate the use of antisense technology for modulating gene expression in *O. oeni*.

Oenococcus oeni is a wine-associated lactic acid bacterium mostly responsible for wine malolactic fermentation (MLF) (1). In wine medium, *O. oeni* evolves under extreme physico-chemical conditions: low pH (3.2 to 3.5), low temperature (18°C), and the presence of biological competitors such as yeast, producing inhibitory compounds, i.e., fatty acids, ethanol, 2-phenylethanol, and sulfites. The winemaking process itself may also constitute a hostile factor for bacterial growth. All these hostile environmental factors can cause a delay in MLF initiation. Thus, this fermentation step is currently not yet fully managed. However, the gradual increase in the ethanol level in wine during the alcoholic fermentation performed by yeasts and the production of substances inhibiting growth of lactic acid bacteria (dodecanoic acid or decanoic acid) led to the selection of the species most suited and adapted to wine conditions: *O. oeni* (1, 2). A better understanding of the mechanisms involved in stress-adaptive responses is essential to improve *O. oeni* development in wine and to perfect industrial processes of preparing wine malolactic starter. Because of its acidophilic properties, *O. oeni* is an interesting model for investigating stress response mechanisms in lactic acid bacteria (LAB). Like any organism undergoing an environmental stress, *O. oeni* tries to restore a metabolic profile beneficial for survival. Over the past decades, several mechanisms involved in adaptation to wine were described, including genes related to the general stress response, membrane composition and fluidity, pH homeostasis, the oxidative stress response, and DNA damage (3–8). To survive, *O. oeni* is known to set up transitional stress response mechanisms through the synthesis of heat stress proteins (HSPs) encoded by the *hsp* genes, notably a single small HSP (sHSP) named Lo18 (3, 6, 9, 10), whose synthesis is induced by multiple stresses such as heat, ethanol, low pH, or addition of

benzyl alcohol membrane fluidifier (5, 11–13). sHSPs are ubiquitous proteins found throughout all biological domains and characterized by a sequence of about 100 amino acids residues called the α -crystallin (14). These proteins have a cytoplasmic molecular chaperone activity, and some of them were shown to be membrane associated and to play a role in membrane quality control (15).

Several studies have investigated Lo18 function *in vitro* using either heterologous (11, 16) or *in vitro* (17) systems. Under stress conditions, Lo18 is produced in large amounts (10), notably during ethanol stress (5, 10). Lo18 was shown to interact with the cytoplasmic membrane under stress conditions, suggesting that Lo18 could be involved in stress adaptation as a lipochaperone (5). Possible lipochaperone activity and molecular chaperone activity of Lo18 have been examined *in vitro*. Purified Lo18 protein was able to stabilize liposome fluidity (5) and to prevent protein aggregation (18). Since *O. oeni* is not a genetically tractable bacterium and has no available efficient expression plasmid for genetic studies, mutant construction is not presently practicable for inves-

Received 3 August 2015 Accepted 1 October 2015

Accepted manuscript posted online 9 October 2015

Citation Darsonval M, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C. 2016. The antisense RNA approach: a new application for *in vivo* investigation of the stress response of *Oenococcus oeni*, a wine-associated lactic acid bacterium. Appl Environ Microbiol 82:18–26. doi:10.1128/AEM.02495-15.

Editor: C. A. Elkins

Address correspondence to Cosette Grandvalet, cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or characteristics ^a	Source or reference
<i>Escherichia coli</i> strains		
EC101	JM101[<i>supE thi (lac proAB) F' traD36 proAB lacI^q ZΔM15</i>] with <i>repA</i> from pWV01 integrated in chromosome	Promega (Lyon, France)
EcAS18	EC101 harboring pSIPSYN <i>hsp18</i> -ORF	This study
EcAS18-UTR	EC101 harboring pSIPSYN <i>hsp18</i> -5' UTR	This study
Ecsyn	EC101 harboring pSIPSYN	This study
<i>Oenococcus oeni</i> strains		
ATCC BAA-1163	Wild-type strain, Van ^r	Laboratory stock
OoS18	ATCC BAA-1163 harboring pSIPSYNAS <i>hsp18</i> -ORF	This study
OoS18-UTR	ATCC BAA-1163 harboring pSIPSYNAS <i>hsp18</i> -RBS	This study
Oosyn	ATCC BAA-1163 harboring pSIPSYN	This study
Plasmids		
pGID052	Ery ^r Linco ^r ; 3.38-kb HindIII DNA fragment of pLC22R, <i>oriR</i> of pLC22R	36
pSYNS3	Ery ^r Linco ^r ; derived from pGID052, P _{SYN} promoter cloned between SmaI and PvuII sites	This study
pSIP409	Ery ^r Ori ⁺ Rep ₂₅₆ <i>sppK sppR gusA</i> , under control of P _{orfX} promoter from pSIP401	41
pSIPSYN	Ery ^r Linco ^r ; derived from pSIP409, deletion of <i>sppK</i> , <i>sppR</i> , and <i>gusA</i> , under control of P _{SYN} promoter	This study
pSIPSYNAS18	Ery ^r Linco ^r ; derived from pSIPSYN, ORF <i>hsp18</i> in antisense orientation under control of P _{SYN} promoter	This study
pSIPSYNAS18-UTR	Ery ^r Linco ^r ; derived from pSIPSYN, 5' UTR <i>hsp18</i> in antisense orientation under control of P _{SYN} promoter	This study

^a Van^r, vancomycin resistance; Ery^r, erythromycin resistance; Linco^r, lincomycin resistance.

targeting Lo18 function *in vivo*. Over the three last decades, the characterization of extrachromosomal DNA and genetic transformation techniques in *O. oeni* have received considerable attention. *O. oeni* transformation is presently possible by electroporation (19). Nevertheless, an efficient expression vector in *O. oeni* is still missing, and site-directed mutagenesis is presently not achievable because transformation efficiencies are lower than the frequency of recombination events (19, 20). Due to the lack of genetic tools for mutagenesis in *O. oeni*, we have focused our research on the antisense mechanism to modulate expression of target genes.

Antisense RNA (asRNA) was defined by Good as “natural or synthetic polymers that specifically recognize and inhibit target sense sequences, with mRNA being the usual target” (21). Diverse antisense mechanisms exist, and the term designates all mechanisms using sequence-specific mRNA recognition leading to reduced or altered expression of a transcript or a sense RNA (22). Antisense mechanisms are very common in nature and can affect mRNA transcription by inducing destruction and repression. Based on base pairing, the asRNA strategy is exploited for protein synthesis inhibition. Because asRNA action does not require modification of the organism's chromosomal DNA, it has a higher throughput than traditional gene inactivation. Moreover, gene deletion strategies are feasible only if the genes are not essential for bacteria survival. While permanent directed inactivation is termed gene knockout, antisense RNA-based gene silencing is described as gene knockdown. Indeed, expression of unmodified RNA targeting the exact antiparallel mRNA sequence is the simplest use of asRNA. Translation inhibition is mainly due either to steric hindrance blocking the translation machinery or to rapid degradation of double-stranded RNA by specific RNases (22). Several studies using asRNA have already been carried out in LAB, demonstrating RNA base-pairing gene inhibition. Baouzzaoui and Lapointe modified the molecular mass of exopolysaccharide by modulating glycosyltransferase gene (*welE*) expression using

asRNA in *Lactobacillus rhamnosus* (23). In *Lactococcus lactis*, an antisense strategy was used to prevent proliferation of four phages (24). More recently, Oddone and collaborators adapted the nisin-controlled expression (NICE) system to express asRNA targeting the *clpP* protease gene in *L. lactis* (25). Several strategies can be considered to develop antisense RNA attenuation. Antisense RNA can be designed to target the entire open reading frame (ORF) of the gene, complementary to the mRNA (23–25). The ribosome binding site (RBS) or a ribosome target at a sequence nearby can also constitute an antisense strategy (21, 26). In this study, the target for antisense expression, *hsp18*, was chosen because it is one of the most well-studied *hsp* genes in *O. oeni*. This study reports the development of an asRNA strategy in *O. oeni* to investigate Lo18 function under stress conditions. This approach was completed by developing the first stable and efficient expression vector in *O. oeni*. We used two targeting strategies: (i) the *hsp18* gene was cloned in the reverse orientation under the control of a LAB constitutive promoter to give rise to a nontranslatable double-stranded RNA molecule, and (ii) the 5' untranslated region (5' UTR) of *hsp18* was cloned in the reverse orientation, complementary to the RBS.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Oenococcus oeni* strain ATCC BAA-1163 is an acidophilic strain isolated from red wine. *O. oeni* was grown at 30°C in FT80m medium (pH 5.3) (27). In preparation for the experiments, *O. oeni* was cultured from glycerol stocks in FT80m medium, which contained 20 μg · ml⁻¹ of vancomycin, 20 μg · ml⁻¹ of lincomycin, and 20 μg · ml⁻¹ of erythromycin when required. For survival tests, cells were used from the *O. oeni* culture to the end of exponential phase ($A_{600} = 0.8$) and then transferred at 48°C or into an acid FT80m medium adjusted to pH 3.5 or pH 3 and incubated at 30°C for 90 min.

Escherichia coli EC101 strain [*supE hsd-5 thi Δ(lac-proAB) F'(traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15) repA⁺*] was used for cloning and maintenance of

TABLE 2 Primers used in this study

Gene or targeted region	Primer or probe	Primer sequence (5' to 3') ^a	Restriction site or DIG labeling
<i>hsp18</i>	ASHsp181	CGT <u>CCCGG</u> ATGGCAAATGAATTAATGGATAGAAATGAT	SmaI
	ASHsp182	GGG <u>CCATG</u> TTATTGGATTTCATATGATGAGTTTGACT	NcoI
5' UTR <i>hsp18</i>	ASHsp18R	GGGCCCGGGTAAGCGGTATGTAATATCACT	SmaI
	ASHsp18F	GGGCCATGGCATATCAAATACCTCCTATTAAAC	NcoI
Synthetic promoter	psynC	GATCAGCTGCCATGGCTGCAGGGATCCCCGGGTACCTCGAGCTCTGAATTCA TTATAGTGATTATTGGTACTAAAGTCAAATTTAAATCCG	
	psynD	CGGATTAAATTTGACTTTAGTACCAATAATCACTATAATGAATTCAGAGCTC GAGGTACCCGGGGATCCCTGCAGCCATGGCAGCTGATC	
	Olgc305	CCC <u>GTCGAC</u> GCAGCAACTGTTGGGAAGGG	Sall
	Olgc302	GGG <u>CCATG</u> GCAAATACCTCCTGATTCAATATGCAGGGGTAC	NcoI
	Olgc303	CCC <u>AAGCTT</u> GCGCAACTGTTGGGAAGGG	HindIII
<i>mhsp18</i> target	DIG-mhsp18 probe	CGAACGACATTATTTTCTGTCTTTTCTCGGCCTTGG	3' end-dUTPDig
<i>ashsp18</i> target	DIG-ashsp18 probe	TGAAAACGATAAAGAATACGGCCTGAAAATCGAACTTCCA	3' end-dUTPDig

^a Restriction sites are underlined, and the RBS is in bold.

plasmids. *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with erythromycin (250 µg · ml⁻¹) when necessary.

DNA manipulation and bacterial transformation. *O. oeni* genomic DNA was extracted using the InstaGene matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR was performed with the Expand high-fidelity PCR system (Roche, Meylan, France). Plasmids from *E. coli* were prepared with the GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Scientific, Illkirch, France). DNA fragments were purified with the GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific, Illkirch, France). T4 DNA ligase and other restriction endonucleases were purchased from New England BioLabs Inc. (Ipswich, USA). Plasmids and ligation products were transferred by electroporation into *E. coli* EC101 by the method of Taketo (28). Briefly, cells in early exponential phase (*A*₆₀₀ of 0.5) were collected from 500 ml of LB culture, washed twice in 250 ml of ice-cold ultrapure water, and concentrated 100-fold in 2.5 ml of 25% glycerol. Aliquots of 0.1 ml were stored at -80°C. Aliquots of 0.1 ml were mixed on ice with plasmid DNA or ligation mixture and then subjected to an electroporation pulse of 25 µF, 200 Ω, and 12.5 kV/cm, followed by addition of 1 ml of LB medium. Cell suspensions were incubated for 20 min at 37°C, followed by plating of 0.1 ml on solid LB medium containing erythromycin (250 µg · ml⁻¹). Plasmids were transferred by electroporation into *O. oeni* as previously described by Assad-Garcia et al. (19). Recombinant strains were selected on FT80m plates supplemented with erythromycin, vancomycin, and lincomycin (20 µg · ml⁻¹ each) (19).

Plasmid constructions and cloning strategy. A synthetic consensus promoter region was designed by aligning the following *O. oeni* gene promoter sequences: *mleR-mleA* (accession number X82326) (29), *clpX* (Y15953) (30), *hsp18* (X99468) (8), *alsS-alsD* (X93091) (31), *clpP-clpL* (AJ606044) (3), *groES* (CAI65392) (6), *grpE* (CAI68011) (6), *dnaG* (EAV39431.1) (C. Grandvalet, unpublished data; direct submission), and *ctsR-clpC* (AJ890338.1) (6). Complementary oligonucleotides psynC and psynD (50 mM each) (Table 2) were annealed by heating (95°C, 5 min) and gently cooling (95°C to 20°C), and the DNA duplex was restricted with SmaI and PvuII restriction enzymes and then subcloned between the SmaI and PvuII sites of plasmid pGID052 (32). The resulting plasmid, named pSYNS3 (Table 1), was then used as a DNA matrix for PCR amplification of the promoter region using oligonucleotides olgc302 and olgc305 (Table 2). An RBS was added by insertion in the sequence of primer olgc302. The resulting PCR product, corresponding to a synthetic promoter called P_{SYN} (KT716344) (this work), was finally cloned between the Sall and NcoI sites of plasmid pSIP409, replacing the sakacin P-based inducible expression system with the synthetic consensus promoter to obtain the plasmid pSIPSYN (33).

Plasmids pSIPSYN18-UTR and pSIPSYN18 were constructed by inserting the amplified 5' UTR *hsp18* region containing the RBS or the full-length coding sequence of the *hsp18* gene, respectively, into the multiple-cloning site of pSIPSYN. The antisense *hsp18* gene inserts were amplified by PCR from *O. oeni* ATCC BAA-1163 genomic DNA using oligonucleotide pairs ASHsp181/ASHsp182 and ASHsp18R/ASHsp18F, respectively (Table 2) and cloned between the NcoI and SmaI restriction sites of pSIPSYN. The resulting plasmids were transferred into *O. oeni* by electroporation (19). The pSIPSYN vector alone was also introduced into *O. oeni* as a control. Positive clones were selected on FT80m plates supplemented with erythromycin, vancomycin, and lincomycin (20 µg · ml⁻¹ each). The presence of plasmids was confirmed by colony PCR amplification with specific primer pair Olgc303/Olgc302 or ASHsp181/ASHsp18R (Table 2).

DNA sequencing and sequence analysis. The plasmid DNA sequences were confirmed by nucleotide sequencing of both strands by Beckman Coulter Genomics (Essex, United Kingdom) using oligonucleotide Olgc303, ASHsp181, or ASHsp18R (Table 2). Nucleotide sequencing results were analyzed using LALIGN software (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Total cellular protein extraction and detection by dot blot hybridization. The cell pellet from 50 ml of culture was suspended in 800 µl of lysis buffer (Tris-HCl [10 mM], NaCl [200 mM], pH 8.8), glass beads (0.5 µm) were added, and cells were lysed by two consecutive 60-s treatments with a Precellys homogenizer (Paris, France) at 6,500 rpm. The suspension was centrifuged at 13,200 × g for 15 min at 4°C to remove intact cells and cellular debris. Supernatants containing total cellular proteins were collected and assayed with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein concentrations were adjusted to 1 µg · µl⁻¹, and 5 µg of from each sample was spotted on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane activated by a 15-min wash in methanol (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). After drying, the membrane was washed twice in 1× phosphate-buffered saline (PBS). After saturation in 1× PBS-5% milk and three washes in 1× PBS-0.2% Triton X-100, the membrane was first hybridized with anti-Lo18 antibody solution (antibody serum from rabbit [1:100] in 1× PBS-0.2% Triton X-100-5% milk) for 1 h at room temperature with gentle shaking (8). The membrane was then washed three times in 1× PBS-0.2% Triton X-100 and incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody solution (1:5,000 in 1× PBS-0.2% Triton X-100-5% milk) (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Before detection, the membrane was washed in 1× PBS-0.2% Triton X-100 for 15 min and four times for 5 min. Chemiluminescence was detected using the ECL kit (Clarity ECL Western blotting substrate; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

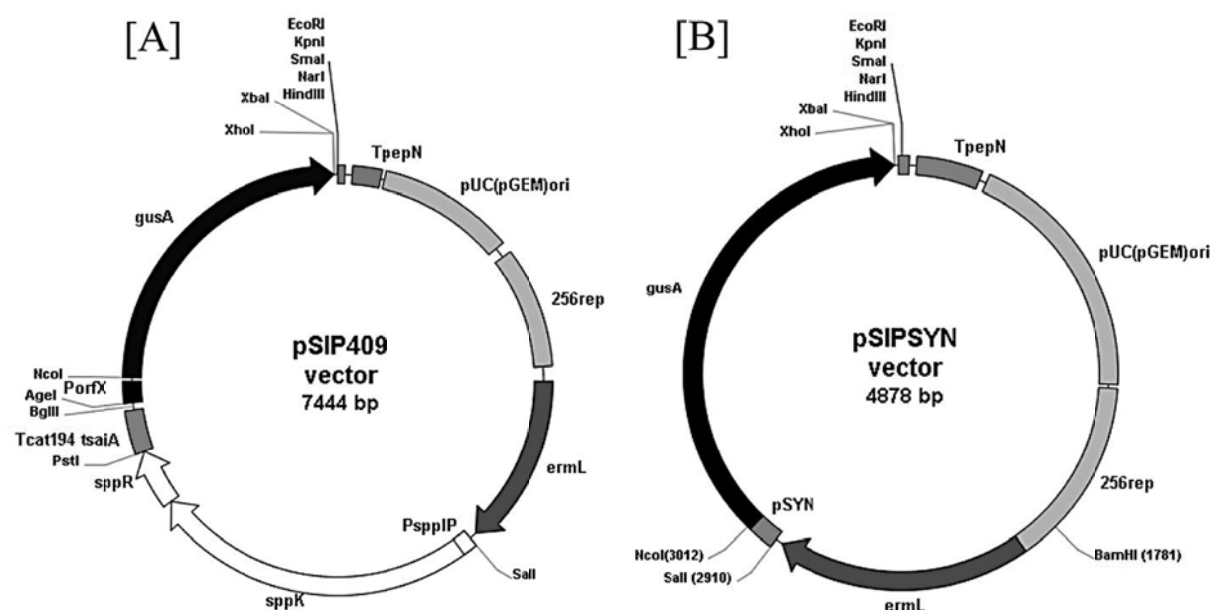


FIG 1 Restriction map of plasmids pSIP409 and pSIPSYN. (A) pSIP409. pSIP409 is a Gram-positive/Gram-negative shuttle vector with the Gram-negative replication origin pUC(GEM)ori, Gram-positive origin of replication 256rep, erythromycin selection (*ermL*), and expression of the reporter gene encoding β-glucuronidase (*gusA*) inducible by addition of a 19-amino-acid peptide pheromone (SppIP, MAGNSSFHFKIKQIFTHR). (B) pSIPSYN. pSIPSYN is a derivative of pSIP409 with removal of the inducible expression system (*sppK*, *sppR*) and replacement of the *P_{oriX}* inducible promoter with a synthetic promoter from *O. oeni* strain ATCC BAA-1163 upstream of the gene *gusA* between the *SalI* and *NcoI* restriction sites.

Membranes were exposed to Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Signal intensity was measured by Image Lab 4.1 (Bio-Rad) to assess the relative quantity of Lo18 protein in each sample. Values are the means of triplicates and were calculated relative to the signal intensity of the control *Oosyn* strain grown at 30°C, which was arbitrarily set as 100%.

Total RNA extraction and detection by dot blot hybridization. The cell pellet from 25 ml of culture was suspended in 100 µl of TE buffer (Tris-HCl [10 mM], EDTA [1 mM], pH 8.0) containing 40 mg · ml⁻¹ of lysozyme and incubated for 30 min at 37°C for cell lysis. The RNA was then purified on a NucleoSpin RNA column according to the manufacturer's recommendations (Macherey Nalgene, Hoerd, France). The RNA samples were then treated with 10 µl of rDNase (Macherey Nalgene, Hoerd, France) at 37°C for 1 h, followed by purification on NucleoSpin RNA with elution in a final volume of 20 µl. The absence of genomic DNA was tested by PCR amplification using universal bacterial primers for the 16S rRNA gene (27F [5'-AGAGTTTGATC[C/A]TGGCTCAG] and 1492R [5'-TACGG[AT/C]TACCTGTTACGACTT]) (34). Then, 10 µg of purified total RNA from each sample was loaded on positively charged nylon membranes (Roche, Laval, Québec, Canada). Oligonucleotide probes were purchased 3' end labeled with digoxigenin (DIG) dideoxy-UTP (Eurogentec, Li  ge, Belgium). After prehybridization for 2 h at 50°C in Dig EasyHyb solution (5× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate], 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS, 2% blocking solution), the probe (10 pmol) was added and hybridization was carried out 15 h at 50°C. After washing the membranes twice for 5 min in 2× SSC–0.1% SDS at room temperature, two 15-min washes were carried out in 0.5× SSC–0.1% SDS at 50°C. To bind the DIG-labeled probes, the membrane was incubated at 25°C for 30 min with antibody solution (alkaline phosphatase-conjugated antidigoxigenin antibody [1:10,000] in blocking solution). Detection of chemiluminescence was performed with disodium 3-(4-methoxyphosphoryl)-1,2-dioxetane-M,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan-4-yl phenyl phosphate (CSPD) as the chemiluminescent sub-

strate according to the manufacturer's recommendations (Roche). Membranes were exposed to Kodak BioMax MS film (Kodak, Mandel Scientific, Guelph, Canada).

Fluorescence anisotropy measurements. The method for membrane fluidity assays was previously validated in our laboratory (35). Cell energization with a 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)-glucose buffer (50 mM MES, 10 mM glucose, KOH buffer [pH 5.5]) was necessary to prevent a decrease of membrane fluidity caused by bacterial death independent of the type of stress. Exponentially growing *O. oeni* cells (20-ml culture at an optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of 0.8) were harvested by centrifugation at 6,300 × *g* for 10 min and washed once in 20 ml of MES-glucose. Pelleted cells were suspended in the same buffer, and the OD₆₀₀ was adjusted to 0.6 for each sample. Hydrophobic 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (Molecular Probes) was used as a probe, and fluorescence anisotropy measurements were performed immediately on the prepared samples as follows: DPH solution (3 µM) was added to the cell suspension, and samples were then placed in the stirred and thermostated spectrofluorometer cuvette holder (Fluorolog-3; Jobin Yvon, Inc., USA). Anisotropy values were calculated as described by Shinitzky and Barenholz (36). To ensure optimal anisotropy determinations, the probe was stabilized at 30°C for 5 min before shock. Ethanol shock was applied to the labeled cells directly during the measurement. Excitation and emission wavelengths were 352 and 402 nm, respectively. Anisotropy values were automatically calculated by the spectrofluorometer as described by Shinitzky and Barenholz (36) as previously reported (4, 35). Fluorescence anisotropy (inversely proportional to membrane fluidity) was measured every 7 s for 45 min. Each experiment was performed at least two times from independent cultures.

Statistical analysis. The significance of the differences among fluorescence anisotropy values and survival tests was determined with a two-tailed Student *t* test. The confidence interval for a difference in the means was set at 95% (*P* ≤ 0.05) for all comparisons.

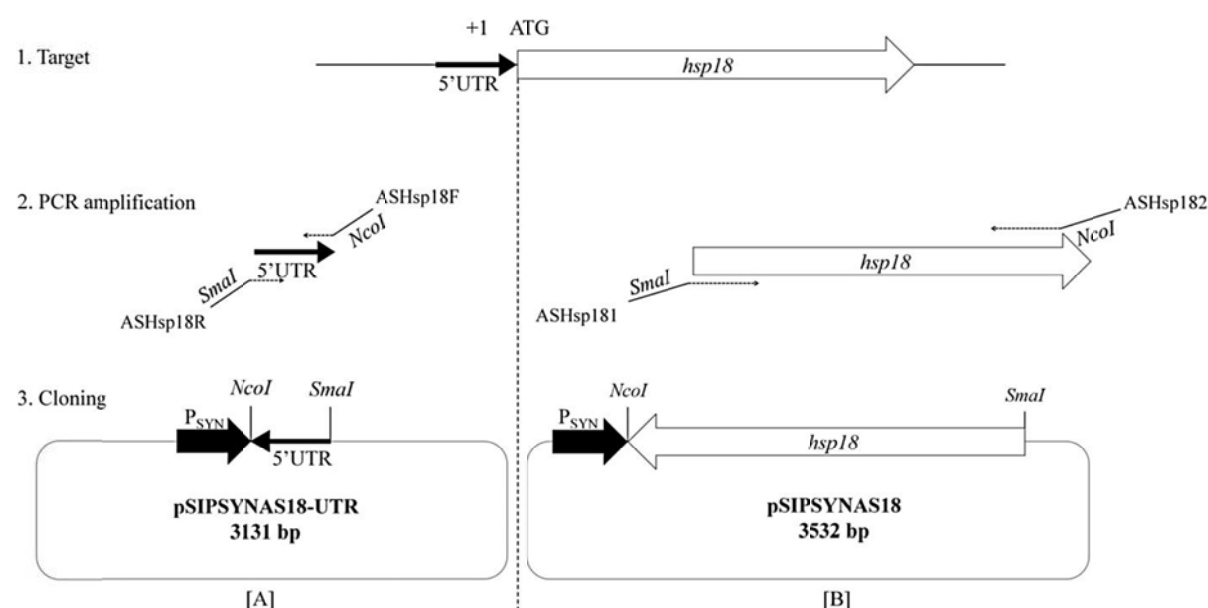


FIG 2 Cloning strategy for antisense *hsp18* expressed under control of the P_{SYN} promoter. Primer sequences are listed in Table 2. (A) Cloning strategy targeting the 5' UTR of *hsp18*. (B) Cloning strategy targeting the full-length *hsp18* gene.

RESULTS

Cloning strategy: construction of expression vector to produce *hsp18* antisense RNAs. The pSIPSYN vector constructed in this work derived from the Gram-negative/Gram-positive shuttle expression vector pSIP409 (Fig. 1; Table 1). Previous work has shown that the sakacin P-based vector pSIP409 was the most promising for inducible expression of *gusA* in lactobacilli such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* (33). Thus, the pSIP409 vector was used as a starting point for studying gene expression in LAB. This vector is a low-copy-number plasmid and stems from the pSIP vector series (33). Previously, our laboratory developed an expression vector in *O. oeni* called pGID052. This vector is a 5.7-kb Gram-positive/Gram-negative shuttle vector which contained a pLC22R region required for replication, measuring 3.38 kb, from *Leuconostoc citreum* and a polylinker from the pUC18 vector. However, this vector does not have any transcription signals and has a substantial size, limiting transformation efficiency. Therefore, we developed a new expression vector from pSIP409 adapted to *O. oeni*. Inducible expression systems, including the *sppR*, *sppK*, and *sppIP* genes and P_{orfX} promoter, appear to be nonfunctional in *O. oeni* (data not shown). Consequently, the new vector was derived from pSIP409 by removing and replacing the sakacin P-inducible expression system with a synthetic promoter designed from alignment of promoter sequences from *O. oeni* genes (see Materials and Methods). The resulting plasmid was named pSIPSYN (Fig. 1B). Using the pSIPSYN vector, two different antisense RNAs of *hsp18* (asRNA-*hsp18*) were produced to modulate *hsp18* gene expression and investigate the knockdown of Lo18 protein levels (Fig. 2). First, the noncoding RNA of the *hsp18* gene 5' UTR was designed by cloning the 5' UTR in antisense orientation to yield pSIPSYNAS18-UTR (Fig. 1B and 2A). Second, the full-length asRNA construction was designed by inserting the

open reading frame of the *hsp18* gene in antisense orientation to obtain plasmid pSIPSYNAS18 (Fig. 1B and 2B). Recombinant vectors, including pSIPSYN, were transferred to *O. oeni* strain ATCC BAA-1163, and recombinant strains were designated Oosyn, OoAS18-UTR, and OoAS18 for strains carrying plasmids pSIPSYN, pSIPSYNAS18-UTR, and pSIPSYNAS18, respectively.

Detection of Lo18 by Western blotting: validation of asRNA function. For each strain and condition, 5 μ g of protein was deposited on membranes and revealed with polyclonal antibodies directed against Lo18. Relative quantities of Lo18 protein were calculated relative to the signal intensity of strain Oosyn grown at 30°C, which was arbitrarily designated 100%. Values are the means of duplicates. Between spot signals of Oosyn, the reference strain, and OoAS18-UTR, no differences in relative protein quantities were observed with (263% and 244%) or without (100% and 114%) thermal shock, indicating that there is no difference in the protein level when the 5' UTR of the *hsp18* gene is targeted by asRNA (Fig. 3). In contrast, the relative quantity of Lo18 in the recombinant strain OoAS18 at 30°C is 32%, indicating that the protein level of Lo18 is lowered 3.1-fold when the whole gene sequence is targeted by asRNA. After a heat shock, the same observation was made, with a 59% relative quantity of Lo18 protein in strain OoAS18 and 263% in strain Oosyn, meaning a 4.5-fold decrease. Having observed a 3.1-fold decrease at 30°C and a 4.5-fold decrease after a heat shock in Lo18 levels by expressing asRNA targeting the whole mRNA of *hsp18* and no differences in the Lo18 protein level by targeting the 5' UTR of *hsp18*, we focused our research on strain OoAS18.

Detection of *hsp18* asRNA and mRNA by Northern blotting: validation of asRNA expression. For each strain and each condition, 10 μ g of RNA was deposited on a nylon membrane. Digoxigenin-labeled RNA probes were used to detect *hsp18* mRNA and

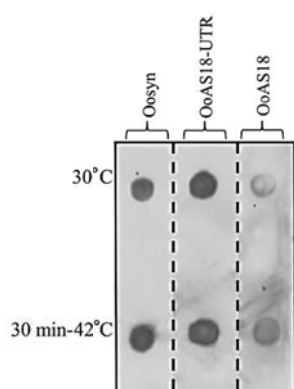


FIG 3 Immunodetection of Lo18 in the *O. oeni* recombinant strains. Strains carrying pSIPSYN (Oosyn), pSINSYNAS18-UTR (OoAS18-UTR), or pSIPSYNAS18 (OoAS18) vectors were cultivated at 30°C in FT80m medium until the end of the exponential growth phase. Total cellular proteins were extracted immediately (30°C) or following a thermal treatment (30 min at 42°C). For each strain and each condition, 5 µg of protein was loaded on a PVDF membrane activated with methanol. After drying the membrane, the *O. oeni* protein Lo18 was detected by immunodetection with polyclonal antibodies directed against Lo18 and anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase. Signal intensity was measured by Image Lab 4.1 (Bio-Rad) to assess relative quantities of the Lo18 protein in each spot.

hsp18 asRNA (Fig. 4). A signal corresponding to *hsp18* mRNA was detected in the Oosyn and OoAS18 strains, and no difference in *hsp18* mRNA levels was observed between the two strains (Fig. 4A). In contrast, a signal corresponding to *hsp18* asRNA was detected in strain OoAS18 but not in Oosyn (Fig. 4B). This observation validates the pSIPSYN vector for expression of asRNA and target genes of interest. Based on this observation, we investigated the physiological effects of attenuation of *hsp18* expression in *O. oeni*.

What is the effect of lower Lo18 levels on *O. oeni* survival under stress conditions? To address the *in vivo* function of *hsp18*, survival tests during stress treatments were performed on recombinant strains Oosyn and OoAS18. Based on *in vitro* studies of Lo18, we focused our physiological study on stresses causing membrane fluidity changes or protein aggregation, such as heat shock or acid shock. Cells were cultivated under optimal growth conditions to the middle of the exponential growth phase and then subjected to different stress treatments. Following CFU counts on agar plates, the cultivability rate was calculated and normalized to that of the reference strain Oosyn (Fig. 5). After a heat shock or acid shock induced by switching the temperature from 30°C to 48°C or the medium pH from 5.3 to 3 or 3.5 for 90 min, no loss of cultivability of strain Oosyn was observed. In contrast, strain OoAS18 lost 95.0% of its population (Fig. 5A). After a pH 3.5 acid shock, the attenuation of Lo18 levels induced a 59.6% loss of cultivability of strain OoAS18 (Fig. 5B). The loss of cultivability was higher when the acid shock was increased to pH 3, with strain OoAS18 losing 98.1% viability (Fig. 5C).

Effect of ethanol shock on membrane fluidity determined by fluorescence anisotropy. Ethanol shock (12 [vol/vol]) gave rise to a 15% decrease of the initial anisotropy value, indicating an instantaneous increase in membrane fluidity (Fig. 6). The fluidifying effect of ethanol was transient. For Oosyn, the reference strain,

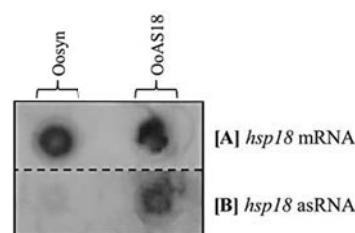


FIG 4 Detection of *hsp18* asRNA and *hsp18* mRNA in the *O. oeni* recombinant strains. Dot blot hybridization with oligonucleotide probe DIG-mhsp18 complementary to mRNA (A) or oligonucleotide probe DIG-ashsp18 complementary to antisense RNA (B) was performed. Recombinant strains carrying the native plasmid (Oosyn) or carrying the plasmid expressing *hsp18* asRNA (OoAS18) were cultivated at 30°C in FT80m medium supplemented with appropriate antibiotics until the end of the exponential growth phase. Total RNA was isolated, and 5 µg of RNA from each strain and each condition was loaded on a nitrocellulose membrane.

membrane fluidity returned to its initial level 40 min after a 12% ethanol shock. After 40 min, the anisotropy value was higher than the initial level, indicating a membrane rigidification.

The reference strain recovered its initial membrane fluidity with a speed of 0.31% anisotropy unit · min⁻¹. The recombinant strain OoAS18 was able to counteract the effect of ethanol shock at a speed comparable to that of the reference strain. Nevertheless, membrane fluidity did not return to the initial level and remained at 96% of the initial value, with no membrane rigidification. The kinetics of membrane fluidity restoration differed significantly between the reference strain Oosyn and the recombinant strain OoAS18.

DISCUSSION

Natural control of gene expression by the antisense strategy has been characterized in many bacteria and eukaryotes (37, 38). This regulatory system, by base pairing using small RNA, has been applied to the investigation of gene function in eukaryotes and is used more and more to study gene function or to modulate phage and plasmid replication (23–25, 39–41). Due to the lack of genetic tools for directed mutagenesis in *O. oeni*, the asRNA production approach is presently a highly promising approach to investigate the stress response in this bacterium. By targeting *hsp18* for knockdown, we undertook the first *in vivo* approach with the aim of studying the only described *O. oeni* sHSP. The expression of a complementary asRNA targeting the full-length *hsp18* gene reduced the levels of Lo18 3.1-fold during growth at 30°C and 4.5-fold after a heat shock at 42°C. In contrast, the targeting by asRNA of the 5' UTR of the *hsp18* gene was not effective. This observation is in agreement with studies performed in LAB using the antisense strategy to target the whole sequences of genes (23, 25, 42, 43). Indeed, the expression of antisense RNA covering the whole gene sequence appeared to be the most effective strategy to inhibit gene expression (43). Moreover, interestingly, reported effective antisense RNA approaches in LAB used 500-bp-length asRNAs, as in our study (23, 25, 43). The 68% decrease in Lo18 protein level at 30°C validated the usefulness and efficiency of the pSIPSYN vector to produce asRNA targeting mRNA and thus to attenuate gene expression in *O. oeni*.

Our Northern dot-blotting analysis allowed validation of the new expression vector by highlighting the presence of *hsp18*

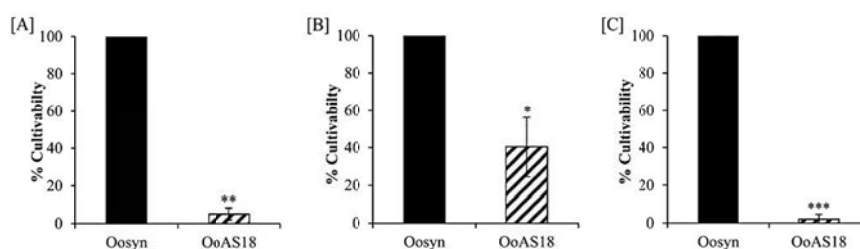


FIG 5 Cultivability tests after stress treatments. Recombinant strains carrying native plasmid (Oosyn) or the plasmid expressing *hsp18* asRNA (OoAS18) were grown at 30°C in FT80m medium until the end of the exponential phase ($A_{600} = 0.8$). Cultures were incubated at 48°C (A), or cells were transferred into FT80m medium adjusted to pH 3.5 (B) or pH 3 (C) and incubated at 30°C for 90 min. Bacterial cultivability was estimated (CFU $\cdot$ ml $^{-1}$). Significant differences are based on unilateral and paired *t* tests. ***, $P < 0.0005$; **, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$.

asRNA. Even though quantities of *hsp18* transcripts were not affected by antisense *hsp18* expression, the Lo18 protein level and the survival capability of *O. oeni* under stress conditions were clearly affected. This result seems to indicate a posttranscriptional action of *hsp18* antisense RNA expression, probably by preventing translation through steric hindrance. The 68% decrease in Lo18 protein detected by Western blotting validates this hypothesis. For asRNA-based regulatory techniques, the physical interaction of asRNA with the targeted mRNA is an essential condition (44). However, the interaction between asRNA and its target does not necessarily lead to the rapid degradation of the double-stranded RNA duplex. Thus, hybridization by base pairing of asRNA with its target can cause the generation of a processing site leading to a translationally inactive or a stabilized form of the targeted mRNA (44). While it is difficult to conclude that the duplex asRNA-mRNA is not targeted by a degradation system, this hypothesis could explain why mRNA levels were only slightly affected in strain OoAS18.

Lo18 is the sole sHSP described in *O. oeni* and is encoded by the best-characterized *in vitro* *hsp* gene of *O. oeni*. Therefore, we selected it as a primary target for antisense RNA in order to unravel its potential *in vivo* role. Expression of the *hsp18* gene is controlled by CtsR, the master transcriptional regulator of *hsp* gene expression in *O. oeni* (6). Lo18 synthesis is induced during the stationary growth phase and is also induced in response to various stresses, such as ethanol, heat, and acid stress (10, 18). Thus, Lo18 seems to

have a cytoplasmic localization, which may allow it to exert a ATP-independent molecular chaperone activity (18). During our investigation of the potential of the asRNA approach, we have demonstrated that asRNA expression under the control of the synthetic promoter gave rise to phenotypic differences between the reference strain Oosyn and the recombinant strain OoAS18. This phenotypic analysis highlighted the role of Lo18 in counteracting stress effects on *O. oeni* whole cells. Thus, the attenuation of *hsp18* expression led to a significant loss of viability after heat shock or acid shock. As previously shown in *E. coli* using a heterologous system (45), our findings finally confirm in *O. oeni* the involvement of Lo18 in the acidophilic capability of bacteria. Indeed, the attenuation of Lo18 levels reduces the stress response ability of *O. oeni* under the acid stress conditions tested. Moreover, Lo18 had an effect on the ability of cells to counteract heat stress. This observation confirms the *in vivo* implication of Lo18 in high-temperature thermoprotection and acid tolerance of stressed cells. The implications of sHSP have been previously explored in *Lactobacillus plantarum*, a wine-related LAB (46). Three small heat shock protein-encoding genes have been previously reported in *L. plantarum* strain WCFS1, *hsp18.5*, *hsp18.55*, and *hsp19.3* (47, 48). The deletion of the *hsp18.55* gene affects cell recovery following short intense heat stress, as well as cell morphology and membrane fluidity of *L. plantarum* cells (46). In addition, the *hsp18* gene of *Streptomyces albus* encodes an sHSP that plays a role in thermotolerance (49), and HSP17 of *Synechocystis* spp. is essential for tolerance to high temperatures (49, 50). In *O. oeni*, Lo18 was shown to be a membrane-associated sHSP displaying a possible lipochaperone activity (5, 8, 17, 18).

Indeed, after addition of benzyl alcohol, a membrane fluidifier, Lo18 was found at the periphery of the membrane, suggesting a role in membrane stabilization during environmental stress and a potential molecular lipochaperone activity (5). Therefore, we assessed the lipochaperone activity of Lo18 by using fluorescence anisotropy analysis with a DPH probe, a method previously used in *O. oeni* (35). Attenuation of *hsp18* gene expression affects the membrane fluidity of *O. oeni* recombinant strains, which immediately decreases after ethanol shock. Our findings demonstrate involvement of Lo18 in modulation of membrane fluidification caused by ethanol. These observations are consistent with previous studies in *O. oeni* during combined and single cold, acid, and ethanol shocks, highlighting a 15% decrease of anisotropy (4, 11, 35). After an ethanol shock, the reference strain Oosyn managed to restore its initial membrane fluidity in 45 min, while the OoAS18 strain failed to restore membrane fluidity to its initial

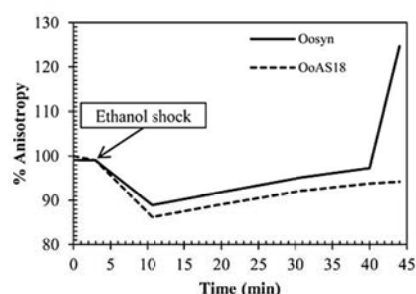


FIG 6 Evolution of membrane fluidity (anisotropy percentage) in *O. oeni* cells during ethanol shock (30°C, pH 5.3, and 12% [vol/vol] ethanol). The reference strain Oosyn (solid line) and the recombinant strain OoAS18 (dashed line) were grown at 30°C in FT80m pH 5.3 medium until the end of the exponential phase ($A_{600} = 0.8$). After an MES-glucose buffer wash, the OD $_{600}$ was adjusted to 0.6 for each sample. Results are expressed as anisotropy percentage as a function of time.

value. Therefore, the attenuation of Lo18 protein level by asRNA targeting prevents the full restoration of membrane fluidity, which remained at 96% of the initial value. The anisotropy results were highly similar to those obtained by Török and coworkers in *Synechocystis* sp. strain PCC6803, where deletion of a small heat shock protein-encoding gene (*hsp17*) was characterized (13). Differences in membrane fluidity were detected when the fluorescence anisotropies of the wild-type and the *hsp17* deletion strains were compared (13). The deletion of *hsp17* showed that membrane fluidity of *hsp17*-deficient cells was remarkably higher than that of the parental cells suggesting that HSP17 may function primarily as a membrane-stabilizing factor. Our results clearly illustrate the membrane-protective role of sHSP during ethanol shock. In fact, our study using the asRNA strategy shows that Lo18 is required for *O. oeni* survival under environmental stress conditions causing fluidification of the membrane and aggregation of cellular proteins.

In summary, our findings indicate that knockdown by the antisense RNA system is presently the most relevant strategy to understand the role of *hsp18*. Moreover, besides technical restrictions, permanent knockout of *hsp18* by directed mutagenesis may not be achievable due to the possibly lethal character of this mutation. We have reported an efficient technique available to investigate the function of stress genes in *O. oeni* and thus to study the stress response ability of this bacterium.

In addition, we can conclude that the pSIPSYN vector designed for this work is an efficient expression vector used to produce asRNA. This new expression vector opens two main perspectives in order to pursue the study of stress response mechanisms in *O. oeni*. This could enable the opening of a real *in vivo* investigation in *O. oeni*. Indeed, the synthetic promoter of the pSIPSYN vector enables constitutive expression in *O. oeni*, which could be a dual potential use of expressing candidate genes or targeting other genes of interest with the antisense approach. Thus, the pSIPSYN vector has already been exploited for gene overexpression to study the impact of *O. oeni* esterase genes on the aromatic quality of wine, opening the doors for wine-associated LAB engineering (M. Darsonval, unpublished data). Regarding the targeting of other genes by the antisense RNA approach, Sturino and Klaenhammer have already stated that the efficiency of the asRNA approach seems to be highly variable and dependent on the choice of the candidate gene targeted for this purpose (24, 43). These observations imply that some key criteria are needed to select an ideal asRNA target. Thus, the asRNA approach will certainly need further adjustments according to the targeted gene. To further study the stress response in *O. oeni*, we plan to target the *ctsR* gene, encoding the unique regulator of stress response gene expression identified in *O. oeni*, which should be ideally suited for this strategy (6).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Magali Maitre for her technical assistance with anisotropy measurements. We are grateful to Lars Axelsson for providing the pSIP409 vector.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (France).

REFERENCES

1. Lonvaud-Funel A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317–331. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1002088931106>.

2. Bartowsky EJ, Borneman AR. 2011. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:441–447. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3546-2>.
3. Beltramo C, Grandvalet C, Pierre F, Guzzo J. 2004. Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* *clpP-clpL* locus expression in response to stress. *J Bacteriol* 186:2200–2205. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.7.2200-2205.2003>.
4. Chu-Ky S, Tourn  t-Maréchal R, Maréchal P-A, Guzzo J. 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1717:118–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2005.09.015>.
5. Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, 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 Biomembr* 1720:92–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2005.11.017>.
6. Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, Guzzo J. 2005. CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J Bacteriol* 187:5614–5623. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005>.
7. Grandvalet C, Assad-Garcia JS, Chu-Ky S, Tollot M, Guzzo J, Gresti J, Tourn  t-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. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/016238-0>.
8. Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Diviès C, 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.
9. Guzzo J, Cavin JF, Diviès C. 1994. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnol Lett* 16: 1189–1194. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01020849>.
10. Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin M-P, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin J-F, Diviès 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. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00042.x>.
11. Maitre M, Weidmann S, Dubois-Brissonnet F, David V, Cov  s J, Guzzo J. 2014. Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Appl Environ Microbiol* 80:2973–2980. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04178-13>.
12. Török Z, Horváth I, Goloubinoff P, Kovács E, Glatz A, Balogh G, V  gh 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.6.2192>.
13. Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, V  gh 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051619498>.
14. Narberhaus F. 2002. α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:64–93. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.66.1.64-93.2002>.
15. Nakamoto H, V  gh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64:294–306. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6321-2>.
16. 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 Microbiol Lett* 309:8–15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01999.x>.
17. Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Fenel D, Schoehn G, Ebel C, Cov  s 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. *Biochem J* 444:97–104. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20120066>.
18. 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*. J Mol Microbiol Biotechnol 3:601–610.
19. Assad-Garcia J, Bonnin-Jusserand M, Garmyn D, Guzzo J, Alexandre H, Grandvalet C. 2008. An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. Lett Appl Microbiol 47:333–338. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02435.x>.
20. Dicks LMT. 1994. Transformation of *Leuconostoc oenos* by electroporation. Biotechnol Tech 8:901–904. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02447736>.
21. Good L. 2003. Translation repression by antisense sequences. Cell Mol Life Sci 60:854–861.
22. Rasmussen LCV, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK. 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. Microb Cell Fact 6:24. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-6-24>.
23. Bouazzaoui K, LaPointe G. 2006. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*. J Microbiol Methods 65:216–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.011>.
24. McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2001. Improvement and optimization of two engineered phage resistance mechanisms in *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 67:608–616. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.2.608-616.2001>.
25. Oddone GM, Mills DA, Block DE. 2009. Dual inducible expression of recombinant GFP and targeted antisense RNA in *Lactococcus lactis*. Plasmid 62:108–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.06.002>.
26. Engdahl HM, Lindell M, Wagner EGH. 2001. Introduction of an RNA stability element at the 5'-end of an antisense RNA cassette increases the inhibition of target RNA translation. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 11:29–40. <http://dx.doi.org/10.1089/108729001750072100>.
27. Cavin JF, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Diviès C. 1989. Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. Appl Environ Microbiol 55:751–753.
28. Taketo A. 1988. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. Biochim Biophys Acta 949:318–324. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90158-3](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(88)90158-3).
29. Labarre C, Diviès C, Guzzo J. 1996. Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 62:4493–4498.
30. Jobin M-P, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J. 1999. The *Oenococcus oeni* *clpX* homologue is a heat shock gene preferentially expressed in exponential growth phase. J Bacteriol 181:6634–6641.
31. Garmyn D, Monnet C, Martineau B, Guzzo J, Cavin J-F, Diviès C. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding α -acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*. FEMS Microbiol Lett 145:445–450.
32. Beltramo C, Oraby M, Bourel G, Garmyn D, Guzzo J. 2004. A new vector, pGID052, for genetic transfer in *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiol Lett 236:53–60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09626.x>.
33. Sorvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH, Axelsson L. 2005. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. Microbiology 151:2439–2449. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28084-0>.
34. Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G. 2001. Isolation and characterization of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. FEMS Microbiol Ecol 36:211–222. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00842.x>.
35. Tourn  t-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Diviès C. 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. Int J Food Microbiol 55:269–273. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00202-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00202-6).
36. Shinitzky M, Barenholz Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. Biochim Biophys Acta Rev Biomembr 515:367–394. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157\(78\)90010-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157(78)90010-2).
37. McGarry TJ, Lindquist S. 1986. Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 83:399–403. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.2.399>.
38. Simons RW, Kleckner N. 1988. Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. Annu Rev Genet 22:567–600. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003031>.
39. Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P. 2003. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. FEBS Lett 552:247–252. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00893-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00893-7).
40. van der Krol AR, Mol JN, Stuitje AR. 1988. Antisense genes in plants: an overview. Gene 72:45–50. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90126-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(88)90126-6).
41. Parish T, Stoker NG. 1997. Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in mycobacteria. FEMS Microbiol Lett 154:151–157. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12637.x>.
42. Kim SG, Batt CA. 1991. Antisense mRNA-mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl Environ Microbiol 57:1109–1113.
43. Sturino JM, Klaenhammer TR. 2004. Antisense RNA targeting of primase interferes with bacteriophage replication in *Streptococcus thermophilus*. Appl Environ Microbiol 70:1735–1743. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1735-1743.2004>.
44. Georg J, Hess WR. 2011. *cis*-Antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 75:286–300. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00032-10>.
45. Morel F, Delmas F, Jobin M-P, Diviès C, Guzzo J. 2001. Improved acid tolerance of a recombinant strain of *Escherichia coli* expressing genes from the acidophilic bacterium *Oenococcus oeni*. Lett Appl Microbiol 33:126–130. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00960.x>.
46. 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. Res Microbiol 162:419–425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.010>.
47. Spano G, Capozzi V, Vernile A, Massa S. 2004. Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 97:774–782. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02359.x>.
48. Spano G, Beneduce L, Perrotta C, Massa S. 2005. Cloning and characterization of the *hsp18.55* gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. Res Microbiol 156:219–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.014>.
49. Servant P, Mazodier P. 1996. Heat induction of *hsp18* gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation. J Bacteriol 178:7031–7036.
50. Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. 2002. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13504–13509. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.192468399>.

1.2. Caractérisation de CtsR : unique régulateur de la réponse au stress chez *O. oeni*

1.2.1. Introduction

Comme tout microorganisme soumis à des changements de conditions environnementales, *O. oeni* est capable d'enclencher des mécanismes transitoires d'adaptation dont la synthèse de protéines de stress via l'induction de l'expression des gènes *hsp* fait partie intégrante (Grandvalet et al. 2005). Si chez *B. subtilis*, l'étude de l'expression des gènes *hsp* a mené à la caractérisation de six classes regroupant les gènes *hsp* selon le mécanisme de contrôle de leur expression (Cf. Synthèse bibliographique II.5.1.a., Tableau 4), il n'en est pas de même chez *O. oeni* où la caractérisation de la régulation de la réponse au stress est encore à l'état d'ébauche (Sugimoto et al. 2008). Chez les bactéries lactiques, outre les systèmes à deux composants intervenant dans la régulation des gènes de classe V), les deux répresseurs transcriptionnels HrcA et CtsR sont conservés et leurs régulons se chevauchent. *O. oeni* se démarque des bactéries lactiques par l'absence de gène *hrcA* dans son génome. CtsR constitue, jusqu'à présent, l'unique chef d'orchestre de l'expression des gènes *hsp* décrit chez cette bactérie lactique. C'est pourquoi ces travaux s'intéressent à la caractérisation de ce répresseur (Grandvalet et al. 2005). Chez *B. subtilis*, la régulation de l'activité de CtsR implique un mécanisme de dégradation par le complexe protéasique ClpCP aidé de deux protéines kinases adaptatrices McsA et McsB (Elsholz et al. 2010; Elsholz et al. 2011a). Chez les bactéries lactiques, dont le génome est dépourvu des deux gènes *mcsA* et *mcsB*, deux mécanismes de régulation ont été récemment décrits: (i) une dégradation spécifique de CtsR par un complexe protéasique ClpEP chez *L. lactis* comparable à celle décrite chez *B. subtilis* (Varmanen et al. 2003) et (ii) une aide au repliement et un maintien de CtsR sous une conformation active en conditions optimales de croissance par le chaperon ClpL chez *S. mutans* (Tao and Biswas 2013b). Si le gène *clpE* est absent du génome de *O. oeni*, deux gènes *clpL* sont représentés et constituent deux candidats d'intérêt dans l'élucidation du mécanisme de régulation de l'activité de CtsR chez *O. oeni*. Cependant, de par les difficultés de manipulation du génome de *O. oeni* cette étude constitue un réel défi.

Face aux difficultés rencontrées au laboratoire pour mener à bien une procédure de mutagenèse dirigée chez *O. oeni*, la caractérisation du gène *ctsR* a été entreprise en système d'expression hétérologue par complémentation d'une souche de *B. subtilis* déficiente pour le gène de *ctsR*. Le choix de *B. subtilis* comme plateforme d'études s'est imposé essentiellement pour sa facilité de

manipulation et la disposition d'outils génétiques pour l'exploration fonctionnelle des gènes. Un système intégratif permettant une expression de *ctsR* inductible par le xylose (Pxyl) associé à un système rapporteur utilisant le gène *bgaB* codant la β -galactosidase de *B. stearothermophilus* en fusion transcriptionnelle avec le promoteur de *hsp18* de *O. oeni* (pDLhsp18) permet de quantifier par dosage enzymatique la répression du gène *hsp18* par CtsR. L'induction de l'expression du gène *ctsR* de *O. oeni* dans le mutant *ctsR* de *B. subtilis* permet de restaurer le phénotype de la souche parentale c'est-à-dire permet de rétablir la répression des gènes *hsp* en conditions optimales de croissance. La thermosensibilité du répresseur CtsR de *O. oeni* a été abordée par l'intermédiaire de tests de thermoinduction sur milieu gélosé contenant un substrat chromogénique de la β -galactosidase (Xgal) et du xylose. Ces tests ont pu montrer que CtsR est inactivé par la température et qu'il peut donc agir comme un thermomètre cellulaire à l'instar de CtsR de *B. subtilis*, *L. lactis* et *G. stearothermophilus*. Néanmoins, CtsR de *O. oeni* est inactivé à une température seuil inférieure à 33°C.

L'exploration fonctionnelle d'un gène passe généralement par la construction et la caractérisation phénotypique du mutant correspondant. Dans un deuxième temps, afin de tenter de contourner les déboires rencontrés lors de la construction de mutant chez *O. oeni*, nous avons appliqué la technique de production d'ARNas mise au point lors de l'étude du chaperon moléculaire Lo18 au locus *ctsR* (Darsonval et al. 2015). L'inhibition de l'expression du gène *ctsR* a induit une perte significative de cultivabilité après un choc thermique (48°C) ou un choc acide (pH3,5) ce qui confirme le rôle clef du locus *ctsR* dans la réponse au stress. Ce phénotype thermosensible a déjà été observée chez le mutant *ctsR* de *L. plantarum* (Fiocco et al. 2010; van Bokhorst-van de Veen et al. 2013). Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une communication affichée lors du congrès internationale GRAM⁺ à Montecatini Terme en Italie (25 au 30 juin 2015). Ils feront par la suite l'objet d'un article qui sera soumis après la réalisation d'une étude complémentaire portant sur l'interaction protéine-protéine entre CtsR et des protéines cibles potentiellement impliquées dans la régulation de son activité.

1.2.2. Article II

Title: “Characterization of CtsR, the master regulator of stress response in *Oenococcus oeni*”

Short title: Combination of antisense RNA approach and heterologous expression system to characterize CtsR activity in *Oenococcus oeni*.

Authors: ¹M. Darsonval, ³T. Msadek, ¹H. Alexandre, ^{1,2}C. Grandvalet.

¹UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress (VALMiS), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France,

²AgroSup Dijon, Institut national supérieur des sciences agronomiques, de l'alimentation et de l'environnement, Dijon – France,

³Unité de biologie des bactéries pathogènes à Gram positif, Institut Pasteur, Paris– France.

Corresponding author: Cosette Grandvalet, Université de Bourgogne – IUVV Jules Guyot, Equipe VALMiS, 1, rue Claude Ladrey - Campus Montmuzard, B.P.27877 - 21078 Dijon, France, e-mail: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr, 03-80-39-62-66.

Molecular characterization of *ctsR*, the master regulator of stress response in *Oenococcus oeni*

¹Maud Darsonval, ^{3,4}Tarek Msadek, ¹Hervé Alexandre, ^{1,2}Cosette Grandvalet.

¹UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress(VAlMiS), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France.

² AgroSup Dijon, Institut national supérieur des sciences agronomiques, de l'alimentation et de l'environnement, Dijon, France

³Unité de biologie des bactéries pathogènes à Gram positif, Institut Pasteur, Paris– France

⁴CNRS ERL 3526, Paris, France

Key-words: *O. oeni*, antisense RNA, stress response, CtsR, heterologous expression system.

To whom correspondence should be addressed: Cosette Grandvalet, Université de Bourgogne – IUVV Jules Guyot, Equipe VAlMiS, 1, rue Claude Ladrey - Campus Montmuzard, B.P.27877 - 21078 Dijon, France, e-mail: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr, 03-80-39-62-66.

SUMMARY

While many stress response genes have been characterized in *Oenococcus oeni*, little is known about the regulation of stress response in this wine-associated lactic acid bacterium (LAB) responsible for wine malolactic fermentation (MLF). Different regulation mechanisms have been described in eubacteria, stress response genes can be regulated negatively as well as positively. In *O. oeni*, CtsR is presently the single and master regulator of stress response gene expression. Widely characterized in *Bacillus subtilis*, CtsR repressor is active as a dimer at 37°C and specifically degraded at higher temperature by proteolytic mechanism involving *mcsA* and *mcsB* genes encoding two adaptive proteins. Nevertheless, *O. oeni* genome has no genes encoding such adaptive proteins. Lack of genetic tool to disrupt *O. oeni* gene led us to develop an innovative technic to overcome of the difficulties of genetic handling of *O. oeni*. In this study, we investigated the *ctsR* function in *O. oeni* by using antisense RNA (asRNA) silencing to modulate *ctsR* gene expression *in vivo*. The recombinant strain with *ctsR* gene expression attenuated by antisense RNA production was exposed to multiple stresses inducing *hsp* gene expression: heat shock, acid shock and presence of ethanol. Interference by asRNA induces significant loss of cultivability under stress conditions demonstrating that CtsR plays a key role in *O. oeni* stress response. Second, we studied the regulation of CtsR activity by using heterologous expression system to complement a *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain with the *ctsR* gene of *O. oeni*. This strategy has shown that *O. oeni* CtsR is a specific thermosensor with distinct temperature threshold. This study demonstrates for the first time the use of antisense technology for modulating a regulator gene expression in *O. oeni*.

Introduction

Oenococcus oeni is a wine-associated lactic acid bacteria (LAB), mainly responsible for wine malolactic fermentation and particularly acidophilic isolated from red wine (Lonvaud-Funel 1999). Wine medium is a stressful environment combining harsh and challenging conditions: low pH, low temperature, presence of ethanol, nutrient starvation and presence of yeasts at the origin of growth inhibitors (ethanol, sulphites and decanoic and dodecanoic acids). As any microorganism under stress, *O. oeni* in wine tries to restore a positive metabolism to survive (Bartowsky and Borneman 2011). Understanding of the mechanisms involved in stress adaptation is an essential step to improve *O. oeni* development in wine and to perfect industrial processes of preparing wine malolactic starter. Because of its acidophilic properties, *O. oeni* is an interesting model to investigate stress response mechanism in LAB. The bacterium is able to display various mechanisms to cope with environmental stress. Over the past decades, several mechanisms involved in wine adaptation were described including genes related to general stress response, membrane composition and fluidity, pH homeostasis, oxidative stress response and DNA damage (Salema et al. 1996b; Jobin et al. 1997; Guzzo et al. 1997; Jobin et al. 1999b; Tourdot-Maréchal et al. 2000; Da Silveira et al. 2003; Beltramo et al. 2004a; Grandvalet et al. 2005; Chu-Ky et al. 2005; Coucheney et al. 2005; Grandvalet et al. 2008; Da Silveira and Abee 2009). To survive, *O. oeni* is known to set up transitional stress response mechanisms through the synthesis of heat stress proteins (HSPs) encoded by the *hsp* genes. Although HSP synthesis is a universal response, microorganisms have diverse regulatory mechanisms to control the expression of *hsp* genes. In firmicutes, *hsp* genes regulation is mediated by alternative sigma factor σ^B and/or by transcriptionnal repressors such as CtsR, HrcA and HspR (Gerth et al. 1998; Derr   et al. 1999b; Varmanen et al. 2000; Gertz et al. 2000; Chastanet et al. 2001; Chastanet and Msadek 2003; Chastanet et al. 2003). In most LAB, the induction of *hsp* genes is dependent to two coexisting and overlapping regulons : HrcA and CtsR (Chastanet et al. 2001; Chastanet and Msadek 2003; Grandvalet et al. 2005; Spano and Massa 2006; Frees et al. 2007). In contrast, in *Bacilli*, both regulons are distinct while in *Staphylococci* HrcA is integrated in CtsR regulon. Both regulons are controlled by a transcriptional repressor which specifically recognized the operator sequence: the palindromic CIRCE sequence (for “Controlling inverted repeat of chaperone expression”) for HrcA and the tandemly repeated heptanucleotidic operator sequence for CtsR (Derr   et al. 1999b; Petersohn et al. 2001). Concerning the regulation of its *hsp* genes, *O. oeni* demonstrates originality since CtsR is the master regulator of stress response gene expression (Grandvalet et al.

2005). Comparative genomics was used to predict genes belonging to CtsR regulon by identifying the heptanucleotidic operator sequence. Most molecular chaperone genes (*dnaK*, *groES*) and *clp* genes exhibit the CtsR operator sites upstream their open reading frames (ORF). The *ctsR* gene of *O. oeni* is cotranscribed with the downstream *clpC* gene. Transcriptional fusions of promotor regions of candidate genes with *bgaB* gene of the β -galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* have been used with *B. subtilis* as heterologous host to show CtsR-dependant regulation of *hsp* genes of *O. oeni*. This was the first example highlighting the exclusive control of *dnaK* and *groESL* by CtsR and not by HrcA (Grandvalet et al. 2005). The sequence analysis of the scaffold *O. oeni* ATCC BAA-1163 genome ([AAUV00000000.1](#)) have revealed no CIRCE sequences and no genes encoding any other known regulators of stress response such as HrcA. In *B. subtilis*, CtsR is active as a dimer and prevents transcription of its regulon by binding its operator sequences in optimal conditions (Derr   et al. 1999b; Derr   et al. 2000). Under stress conditions, the CtsR activity is inhibited by McsA/McsB-mediated phosphorylation and consequent degradation by ClpCP (Derr   et al. 2000; Kirstein et al. 2005; Kirstein et al. 2007; Elsholz et al. 2010; Elsholz et al. 2011a). LAB are *mcsAB*-deficient firmicutes so alternative mechanisms involved in regulation of CtsR activity have been described. In *L. lactis*, ClpE is required to restore the repression by CtsR after heat shock. The substitution of *clpE* by *mcsA* was shown to restore *hsp* gene repression suggesting that ClpE has the same function as McsA by interacting with CtsR via its zinc finger motif (Varmanen et al. 2003). Recently, the work of Tao and Biswas (2013) have shown that the ClpCP complex is not required for specific degradation of CtsR and that ClpL has a chaperone role in the regulation of CtsR activity in *S. mutans* (Tao et al. 2012; Tao and Biswas 2013a). The main actors in the regulation of the CtsR activity described in *B. subtilis* and *L. lactis* (*clpE*, *mcsA* and *mcsB*) are absent from the genome of *O. oeni* while two *clpL* version of the gene are present suggesting that the regulation of CtsR activity in *O. oeni* could be closed to the mechanism described in *S. mutans*. In *L. lactis*, *G. stearothermophilus* and *B. subtilis*, CtsR can feel the heat and its activity can also be regulated by temperature with a distinct thermorepression temperature threshold for each bacterial species (Elsholz et al. 2010). Because of difficulties to genetically manipulate *O. oeni*, the *in vivo* function of CtsR and the mechanism of its activity regulation are still unknown. In this study, we first investigated the CtsR function in *O. oeni* by using antisense RNA silencing to modulate *ctsR* gene expression *in vivo*. This innovative technic, developed in our laboratory, allowed the first modulation of gene expression in *O. oeni*, a so hard genetically handling bacterium (Darsonval et al. 2015, submitted)

and confirmed the molecular chaperon role of the small Hsp Lo18 in *O. oeni*. Second, we studied the regulation of CtsR activity by using heterologous expression system to complement a *B. subtilis* ctsR-deficient strain with the *ctsR* gene of *O. oeni*. Transcriptional fusion of *hsp18* promotor with *bgaB* reporter gene of *G. stearothermophilus* was used to appreciate the complementation. The *in vivo* inhibition of *ctsR* gene expression by producing asRNA targeting the ORF causes significant loss of cultivability after heat shock (58%) and acid shock (59%) and highlighted that CtsR plays a key role in the stress response in *O. oeni*. Transcriptional fusion showed that CtsR of *O. oeni* can restore the parental phenotype of the *ctsR*-deficient strain of *B. subtilis* in optimal growth conditions. Moreover, thermoinduction tests highlighted that *O. oeni* CtsR can feel the heat and is an *in vivo* intrinsic heat sensor with a 33  C distinct temperature threshold. As previously showed in *L. lactis*, *B. subtilis* and *G. stearothermophilus* , the *O. oeni* CtsR is a specific thermosensor (Elsholz et al. 2011a).

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Oenococcus oeni strain ATCC BAA-1163 is an acidophilic strain isolated from red wine. *O. oeni* was grown in FT80m medium which contained 20   g.ml⁻¹ of vancomycin, 20   g.ml⁻¹ of lincomycin and 20   g.ml⁻¹ of erythromycin when required. For survival test, cells were harvested in the end of exponential phase ($A_{600nm} = 0.8$) then transferred at 48  C or into FT80m medium adjusted to pH 3.5 or pH 3 and incubated at 30  C during 90 min. Bacterial cultivability was estimated on agar plates (UFC.ml⁻¹). The growth curve was determined by following the absorbance at 600 nm in a function of time.

Escherichia coli EC101 strain (*supE thi (lacproAB)F' traD36 proAB lacI^q ZAM15*) was used as a host strain for cloning and maintenance of plasmids. *E. coli* was grown at 37  C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with erythromycin (250   g.l⁻¹) or ampicillin (100   g.ml⁻¹) if necessary.

B. subtilis 168 (*trpC2*) and QB4991 [*trpC2amyE ::('lacZapha3)  ctsR*] strains were used as heterologous hosts to measure activities of transcriptional fusions. *B. subtilis* was grown in LB medium supplemented with chloramphenicol (5   g.  l⁻¹), spectinomycin (100   g.  l⁻¹), kanamycin (5   g.  l⁻¹) or erythromycin (25   g.  l⁻¹) when required.

DNA manipulation and bacterial transformation

O. oeni genomic DNA was extracted with InstaGene™ Matrix according to the manufacturer's recommendations (Bio-rad, Hercules, USA). PCR was performed with Expand High Fidelity PCR System (Roche, Meylan, FRANCE) according to the parameters accompanying the polymerase. Plasmids from *E. coli* were prepared with GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Illkirch, FRANCE) according to the protocol provided by the manufacturer. DNA fragments were purified with GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). T4 DNA ligase and restriction endonucleases were purchased from New England Biolabs Inc. (Ipswich, USA) and were used as recommended by the manufacturer. Plasmids and ligation products were transferred by electroporation into *E. coli* EC101 by electroporation method (Taketo 1988). Briefly cells, in early exponential phase (A_{600} of 0.5), were collected from 500 ml of LB culture, washed twice in 250 ml of ice-cold ultra-pure water and concentrated 100-fold in 2.5 ml of 25% glycerol. Aliquots of 0.1 ml were stored at -80°C . Aliquots of 0.1 ml were mixed on ice with plasmid DNA or ligation mixture, and then submitted to an electroporation pulse of $25\mu\text{F}$, 200Ω , and 12.5 kV/cm , followed by addition of 1 ml of LB medium. Cells suspension were incubated for 20 min at 37°C , followed by plating of 0.1 ml on solid LB medium containing erythromycin ($250\mu\text{g.ml}^{-1}$). Plasmids were transferred by electroporation into *O. oeni* as previously described by Assad Garcia et al. (2008). Recombinant strains were selected on FT80m plates supplemented with erythromycin, vancomycin and lincomycin ($20\mu\text{g.ml}^{-1}$ each) (Assad-García et al. 2008). *B. subtilis* was transformed with recombinant vectors as previously described by Msadek et al. (1998). Transformants were selected on agar LB medium supplemented with chloramphenicol ($5\mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$), spectinomycin ($100\mu\text{g.ml}^{-1}$), kanamycin ($5\mu\text{g.ml}^{-1}$) or erythromycin ($25\mu\text{g.ml}^{-1}$).

Plasmid constructions and cloning strategy

Primers and vectors used in this study are listed in Table 2.

Plasmid pSIPSYNASCsTsR was constructed by inserting respectively the amplified full-length of the open reading frame of *ctsR* gene into the multiple cloning site of pSIPSYN by inverting orientation. The insert of antisense *ctsR* gene was amplified by PCR from *O. oeni* ATCC BAA-1163 genomic DNA using respectively couple of primers ASCtsR3-6 designated in Table 2 and was cloned into *NcoI* and *SmaI* restriction sites of the pSIPSYN vector. The resulting plasmid carrying the complete antisense *ctsR* gene under the control of synthetic promotor, pSIPSYNASCsTsR was transferred into *O. oeni* by electroporation (Assad-García et al. 2008). The

vector pSIPSYN without any insert was also transferred into *O. oeni* to act as a reference. The presence of vector was confirmed by colony PCR amplification with specific primers: Olcg303 and Olcg302 or ASCtsR3 primers. One colony was suspended in 50µl of lysis buffer (EDTA 100mM, pH8, Proteinase K 20mg.ml⁻¹) and then mixed by vortex. The resulting mix was heated 15 min at 65°C then 5 min 95°C and 5µl of this mix was added to PCR mix. The corresponding *O. oeni* recombinant strain was designated by OoASCtsR.

Table 1: Details of the strains used in this study

Strain	Genotype ¹	Source or Reference
<i>Escherichia coli</i>		
EC101	<i>E. coli</i> JM101(<i>supE thi (lacproAB) (F' traD36 proAB lacI^q ZAM15)</i> with <i>repA</i> from pWV01 integrated in chromosome	Laboratory stock (Law et al. 1995b)
EcASCtsR	<i>E.coli</i> EC101, pSIPSYNAscTsR	This study
Ecsyn	<i>E. coli</i> EC101, pSIPSYN	This study
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> BF- <i>dcm ompT hsdS(r_B- m_B-)</i> gal [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)	ThermoScientific
<i>Oenococcus oeni</i>		
ATCC BAA-1163	wild type strain, van ^R	Laboratory stock
OoASCtsR	<i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163, pSIPSYNAscTsR	This study
Oosyn	<i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163, pSIPSYN	This study
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Wild type strain, <i>trpC2</i>	T. Msadek
168hsp18'	<i>trpC2 amyE ::(hps18'-bgaB cat)</i>	This study
QB4991	<i>B. subtilis</i> 168 <i>trpC2 ΔctsR amyE ::('lacZ aph3)</i>	(Derré et al. 1999a)
QBhsp18'	<i>B. subtilis</i> QB4991 <i>trpC2 ΔctsR amyE ::(hps18'-bgaB cat)</i>	This study
QBhsp18'-XTctsR	<i>B. subtilis</i> QB4991 <i>trpC2 ΔctsR amyE ::(hps18'-bgaB cat)</i> <i>thrC::(pxylA-ctsR_{O. oeni} spc)</i>	This study

¹ van^R: vancomycin resistance.

The pDLhsp18 vector (Grandvalet et al. 2005) was used to construct transcriptional fusion of *hsp18* promoteur (AJ250422) with the *bgaB* gene encoding a thermostable β-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* : *hsp18'-bgaB*. The resulting plasmid, pDLhps18 was integrated in *amyE* locus in *B. subtilis* 168 and QB4991 strains. Plasmid pXTCtsR25 was obtained by cloning the full-length of *ctsR* coding sequence under the control of xylose inducible promoter between *Bam*HI *Hind*III restriction sites. The resulting plasmid was integrated in *thrC* locus in *B. subtilis* 168 and QB4991 strains. Vectors were transferred in *B. subtilis* as previously described by Msadek et al. (1998) and the presence of vectors was confirmed by colony PCR amplification with specific primers CtsR2-5 and olcg16-20.

DNA sequencing and sequence analysis

The sequences of both strands of plasmids were confirmed by nucleotide sequencing with labeling and capillary separation on the AB3730xl performed by Beckman Coulter Genomics (Essex, United Kingdom). The Olcg303 and ASHSP181 or ASHPS18R primers were used for

this purpose. Nucleotide sequencing results were analyzed using LALIGN software ([www.ch.embnet.org /software/LALIGN](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN)).

Table 2: Vectors and primers used in this study

Targets	Primers	Primer sequences (5'-3') ¹	Restriction sites ²
<i>ctsR</i>	ASctsR3	cgtCCCGGGATGGCAGAAGCTAATATTTTCAGAT	<i>Sma</i> I
	ASctsR6	gggCCATGGCAGATGCTGTGTATTGATTATCCA	<i>Nco</i> I
	ctsR2	CGGACTAAGCTTTTATCCATGAATGTTTGTACTC	<i>Hind</i> III
	ctsR5	T CCGGGAGGATCCAAAGGAGGGGGTTGAATG	<i>Bam</i> HI
<i>hsp18</i> promoteur	Olcg16	ATCGGC ^{GGATCCT} ATCAAATACCTCCTATTAACT	<i>Bam</i> HI
	Olcg20	AA GCCCCGAATTCTAAATTAATCGAAGCCTTTTGAC	<i>Eco</i> RI
	Olcg302	GGGCCATGGCAAATACCTCCTGATTCATTAATG	<i>Nco</i> I
	Olcg303	CAGGGGTAC CCCAAGCTT ^{TCGCAACT} GTTGGGAAGGG	<i>Hind</i> III
Vectors	Characteristics		Source or reference
pSIPSYN	ery ^R , lm ^R , derived from pSIP409, deletion of <i>sppK</i> , <i>sppR</i> , <i>gusA</i> under the control of P _{SYN} promoter		(Darsonval et al. 2015)
pSIPSYNASCtsR	ery ^R , lm ^R , derived from pSIPSYN, ORF _{ctsR} in antisense orientation under the control of P _{SYN} promoter		This study
pET28a (+)	pT7 promoter, lacI, kan ^R		ThermoScientific
pETCtsR	kan ^R , pET28a(+) derivative carrying <i>O. oeni ctsR</i> coding sequence.		This study
pXT	spec ^R , amp ^R , pDG1728 derivative allowing gene expression from the p _{xylA} xylose inducible promoter		(A.Galaznik, unpublished data), (Guérout-Fleury et al. 1996)
pXTCtsR25	spec ^R , amp ^R , pXT derivative carrying the <i>O. oeni ctsR</i> coding sequence		This study
pDL	cm ^R , <i>B. subtilis</i> integration vector with <i>bgaB</i> as the reporter gene from <i>G. stearothermophilus</i>		(Yuan and Wong 1995)
pDL _{hsp18}	cm ^R , dérivé du pDL portant une fusion <i>hsp18'-bgaB</i>		(Grandvalet et al. 2005)

¹ Restriction sites are underlined.

² van^R: vancomycin resistance, ery^R: erythromycin resistance and lm^R: lincomycin resistance cm^R: chloramphenicol resistance, spec^R: spectinomycin resistance, amp^R: ampicillin resistance kan^R: kanamycin resistance.

Total cellular Protein extraction and detection western-blotting

The synthesis of CtsR was detected at proteic level by immunodetection with polyclonal antibodies directed against CtsR of *O. oeni*. The pellet from 50 ml of culture was suspended in 800 µl of lysis buffer (Tris-HCl 10 mM ; NaCl 200mM ; pH 8.8). Cells were transferred with glass beads (0.5µm) and lysed twice with Precellys action (Paris, France) as follow 60 sec-20 sec-60 sec at 6,500g. The suspension was centrifuged at 13,200 g for 15 min at 4°C to remove unbroken cells and cellular debris. Supernatants containing total cellular proteins were collected and assayed with Bio-rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate according to the manufacturer's recommendations with bovine serum albumin as the standard (Bio-rad). After

mixing with Laemmli buffer and heat denaturation (Laemmli 1970), 20 µg of total cellular proteins from each sample were loaded on denaturing polyacrylamide Gel (12%). Proteins were then transferred on a PVDF membrane activated by 15 min-wash in methanol (GE. Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). After saturation in 1X PBS-5% milk and three washes in 1X PBS-0.2% Triton100, the membrane was first hybridized with Anti-CtsR Antibody Solution (See below) (Antibody serum from Rabbit 1:5000 in 1X PBS, 0.2% Triton100, 5% milk) for one hour at room temperature with gentle agitation. Then, the membrane was washed three times in 1X PBS-0.2% Triton X-100 and incubated one hour at room temperature in conjugated peroxidase Anti-Rabbit Antibody solution (Antibody from goat 1:5000 in 1X PBS, 0.2% Triton100, 5% milk, GE. Healthcare). Before detection, the membrane was washed in 1X PBS, 0.2% Triton X-100 for 15 min and four times during 5 min. After squeezing out liquid excess, the chemoluminescence was detected by using ECL Kit (Clarity™ ECL Western Blotting Substrate, Bio-rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Membranes were exposed to Amersham Hyperfilm ECL which was developed as recommended by the manufacturer (GE. Healthcare).

Preparation of polyclonal antibodies.

CtsR was purified from *E. coli* pETCtsR strain, and polyclonal antibodies were obtained by direct immunization of a rabbit with the purified protein.

Galactosidase activity assays and thermoinduction test

Overnight cultures of *B. subtilis* grown on LB medium supplemented with chloramphenicol (5 µg.ml⁻¹) were diluted to an optical density at 600 nm of 0.05 in fresh broth medium and grown at 30°C, 37°C, 42°C with agitation (140 rpm) until the mid-exponential phase was reached ($A_{600nm} = 1$), after the xylose was adding to induce *ctsR* gene expression during 12h ($A_{600nm} = 3$). For each sample, the β-galactosidase activity was determined as described previously (Miller 1972; Grandvalet et al. 2005) and the activity was expressed as Miller units per mg cellular protein. Protein concentrations were determined using the Bradford method (see above). Experiments were performed three times on three independent cultures.

The β-galactosidase activity was estimated on LB plates by hydrolyzing of its colorated substrate, the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyransidase (X-gal). The *B. subtilis* heterologous host strains were plated on agar LB medium containing X-gal to display CtsR binding on *hsp18*

promotor *via* the transcriptional fusion *hsp18'-bgaB* and xylose (20mM) to induce the expression of *ctsR* gene. For each strain, experiment was performed on four different plates in parallel to incubate at six different temperatures: 30°C, 33°C, 35°C, 37°C, 42°C et 50°C. The thermosensibility of *O. oeni* CtsR was appreciated with the white-blue screen.

Statistical analysis

The significance of the difference among percentage of cultivability values was determined by a two-tailed Student t-test. The confidence interval for a difference in the means was set at 95% ($P \leq 0.05$) for all comparisons.

Results

The inhibition of *ctsR* gene expression affects the survival abilities of *O. oeni* under stress conditions. Due to the lack of genetic tool in *O. oeni*, antisens RNA approach were used to characterize the function of *O. oeni ctsR* gene. To address the *in vivo* function of *ctsR* in *O. oeni*, survival tests during stress treatments were performed on recombinant strains *O. oeni* carrying native plasmid (Oosyn) or recombinant plasmid with asRNA targeting *ctsR* messenger (OoASCtsR). Based on previous studies on *O. oeni* stress response, we have focused our physiological study on stress causing induction of *hsp* gene expression in *O. oeni*. The cells were cultivated in optimal growth conditions until the middle of the exponential growth phase and then underwent different stress treatments. After enumeration of CFU on agar plates, the cultivability rate is calculated and then normalized to the reference strain Oosyn. After switching growth temperature from 30°C to 48°C or the pH medium from 5.3 to 3.5 maintained for 90 min, no loss of cultivability of Oosyn strain was observed. In contrast, OoASCtsR strain loses 58.0 % of its population (Figure 1(1)). After a pH 3.5 acid shock, the modulation of *ctsR* expression level induces a 59 % loss of cultivability of OoASCtsR strain (Figure 1(2)). These observations strongly confirm that CtsR plays a key role in *O. oeni* stress response.

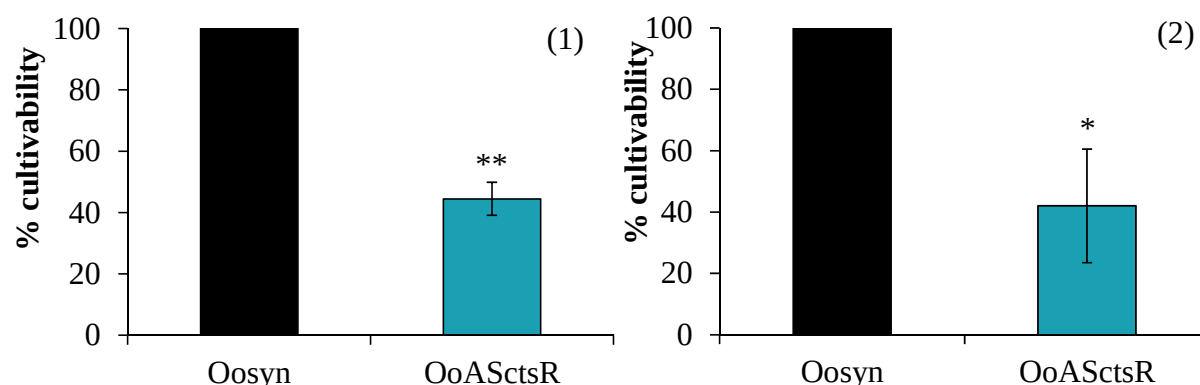


Figure 1: Cultivability tests after heat shock (1) or acid shock at pH3.5 (2). Recombinant strains carrying native plasmid (Oosyn in black) or plasmid carrying asRNA targeting *ctsR* (OoASctsR in green) were grown at 30°C until mid-exponential phase. Cultures were then transferred 90 min at 48°C (1) or into a pH3.5 FT80m medium (2). Cultivability was estimated on agar plate (CFU.ml⁻¹). Significant differences are based on an unilateral and paired T test (** $P < 0,005$, * $P < 0,05$).

The *ctsR* gene of *O. oeni* can complement the *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain. Considering the difficulties to genetically manipulate *O. oeni*, *B. subtilis* was used as a platform for molecular characterization of stress response in *O. oeni*. The *ctsR* gene of *O. oeni* was expressed by inducible heterologous expression system in the *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain (QB4991) (Derré et al. 1999a). The pXTCtsR25 plasmid carrying the *ctsR* gene under control of the *PxylA* xylose-inducible promoter and allowing integration at the *thrC* locus was used to complement *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain (see Materiel and methods). The *O. oeni* CtsR protein was immunodetected in the *ctsR*-deficient strain when xylose was added to the growth medium (Figure 2) assessing the heterologous expression of the *ctsR* gene. In order to assess the functionality of the *O. oeni* CtsR, complement experimentations were performed in *B. subtilis* strain carrying the *hsp18'-bgaB* fusion at the *amyE* locus. Transcriptional fusion between the *O. oeni* *hsp18* promotor region and the *bgaB* gene allows monitoring repression activity by the *O. oeni* CtsR repressor. The β -galactosidase activities of strains were monitored after growth in LB broth medium supplemented or not with xylose to induce the *O. oeni* *ctsR* gene expression. As expected, compare to wild type strain, the β -galactosidase activity of the *hsp18'-bgaB* fusion was increased 105.5-fold in the *ctsR*-deficient strain in the absence of xylose in the culture medium (figure 3). In xylose supplemented medium, the *hsp18'-bgaB* expression is comparable to the wild type strain level (induction rate 9.4). These results confirm the functionality of the *O. oeni* *ctsR* gene to complement a *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain.

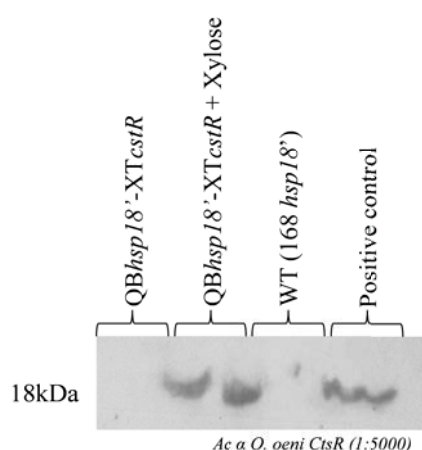


Figure 2: Immunodetection of the *O. oeni* CtsR protein in *B. subtilis* strains. *B. subtilis* strains were grown at 30°C in LB medium. The medium was supplemented by xylose (20 mM) to induce *ctsR* expression in complemented *ctsR*-deficient strain (QBhsp18'-XTctsR + xylose). Cells were harvested at the end of stationary growth phase. Total cellular proteins were extracted from wild-type strain (168hsp18') and complemented *ctsR*-deficient strain (QBhsp18'-XTctsR and QBhsp18'-XTctsR + xylose). CtsR protein purifies from cell extract of *E. coli* pETCtsR strain was used as positive control (Positive control). The *O. oeni* protein repressor was detected by immunodetection with polyclonal antibodies directed against CtsR and anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (1 :5000).

The *O. oeni* CtsR can feel the heat. To verify that CtsR is an intrinsic heat sensor as previously described for *B. subtilis*, *L. lactis* and *G. stearothermophilus* CtsR repressor, complementation of heterologous *ctsR* expressed in trans was monitored at different temperature by blue/white screening on X-gal containing LB-agar plates using hsp18'-bgaB reporter gene fusion. Six different temperatures: 30°C, 33°C, 35°C, 37°C, 42°C and 50°C were used to appreciate the thermosensibility of *O. oeni* CtsR with the white-blue screen (Figure 4). White colonies correspond to the transcriptional repression of *hsp18* by *trans* expressed *ctsR*. White-blue colonies indicate the expression of *hsp18* thanks to an inactive CtsR. In parental strain *B. subtilis* (figure 4, lane 1, 168-hsp18'), the CtsR regulator is active and represses the *hsp18'-bgaB* expression at 30°C to 37°C. At 42°C and 50°C, a blue color appears meaning that CtsR is inactive. These results show that the *B. subtilis* CtsR is active until 42°C. Considering the complemented strain deficient for the *ctsR* gene in absence of xylose, (figure 4, lane 2, QBhsp18'-XTctsR), the appearance of a blue coloration regardless of the incubation temperature means a constitutive expression of *hsp18'-bgaB* transcriptional fusion due to absence of active CtsR repressor. The *trans* expression of the *O. oeni* *ctsR* gene by adding xylose (figure 4, lane 3) suppresses the expression of *hsp18'-bgaB* at 30°C by binding to the *hsp18* promoter region whereas the *O. oeni* repressor is inactive at temperatures above 30°C (33°C, 37°C, 42°C and 50°C). The *O. oeni* CtsR is active at 30°C, the optimal growth temperature and inactive at 33°C. These results strongly suggest that the *O. oeni* CtsR repressor is an intrinsic heat sensor *in vivo* with a specific temperature threshold of 33°C.

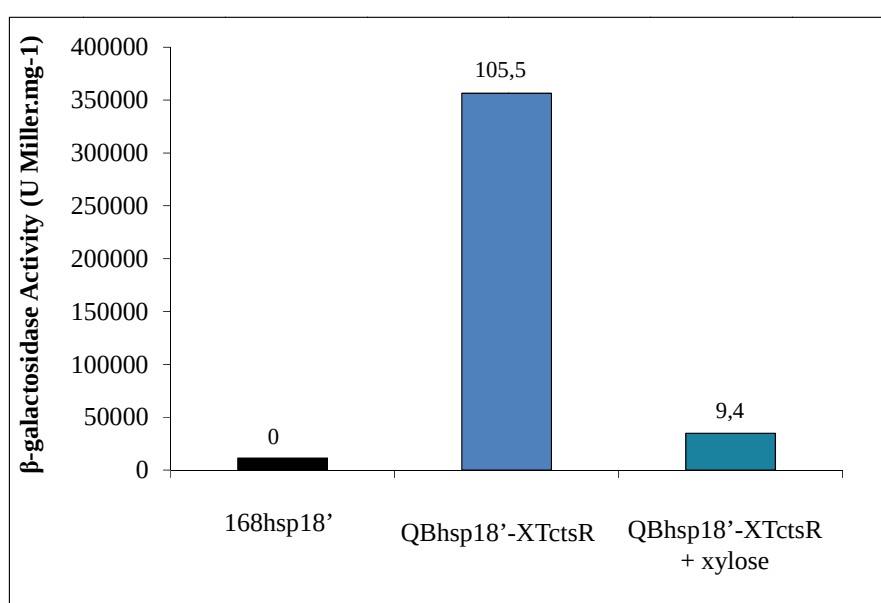


Figure 3: The heterologous *O. oeni* CtsR negatively regulates the *hsp18'-bgaB* transcriptional fusion gene expression in *B. subtilis*. Expression of the *hsp18'-bgaB* transcriptional fusion was measured in the wild-type strain (QBhsp18') and the *ctsR*-deficient strain (QBhsp18'-XTctsR and QBhsp18'-XTctsR + Xylose). Cells were grown in LB medium at 30 C until the end of stationary growth phase. To induce *ctsR* expression, LB medium was supplemented with xylose (20 mM) when complemented *ctsR*-deficient strain cultures reach the mid-exponential growth phase and cells were harvested 12h after xylose induction.

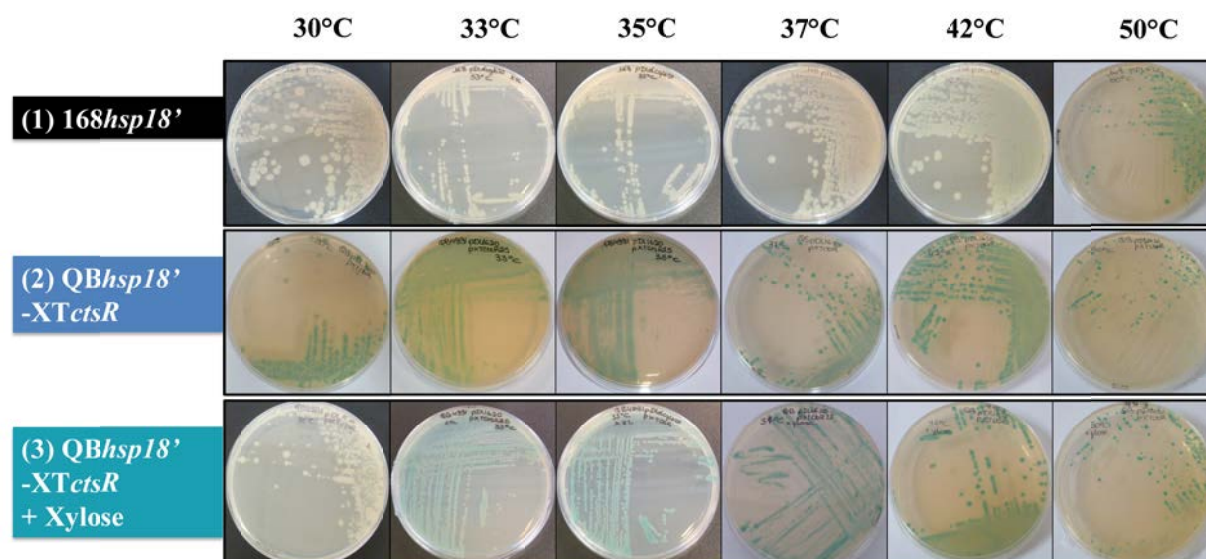


Figure 4: The *O. oeni* CtsR repressor is a specific thermosensor. *O. oeni ctsR* was over-expressed in *B. subtilis ctsR*-deficient strain (QBhsp18'-XTctsR) under control of a xylose-inducible promotor. Complementation by heterologous *ctsR* expressed in *trans* was monitored at different temperatures (30 C, 33 C, 35 C, 37 C, 42 C and 50 C) by blue/white screening on X-gal containing LB-agar plates using a thermostable *hsp18'-bgaB* reporter gene fusion. White colonies show that *hsp18* transcription was repressed by *trans* CtsR, whereas blue colonies indicate a transcriptional derepression of *hsp18* because of absence of CtsR protein (line 2) or presence of an inactive *trans* CtsR (line 1 and 3).

Discussion

Because of *O. oeni* is not easily genetically manipulated due to poor transformability and the obvious lack of genetic tools, little is known about its gene regulatory mechanisms in *O. oeni*. Due to the obvious lack of genetic tools to consider directed mutagenesis in *O. oeni*, asRNA production approach is presently the ultimate approach to investigate stress response in this bacterium (Darsonval et al. 2015). By targeting *ctsR* for knockdown, we undertook an *in vivo* approach with the aim of deepening the knowledge of the *O. oeni* CtsR, the unique stress response regulator described. The expression of a complementary asRNA targeting the full-length of *ctsR* gene reduced by half the cultivability after heat shock or acid shock protein. In this study, our findings indicate that the knockdown by antisense RNA system is, as already shown by our previous work, the most relevant strategy to understand the role of *O. oeni* genes (Darsonval et al. 2015). Moreover, besides technical restrictions, permanent knockout of *ctsR* by directed mutagenesis may not be achievable due to the possibly lethal character of this mutation. The *ctsR* inhibition by asRNA approach has deleterious effect on viability of *O. oeni* after sub-lethal temperature stress exposure or acid stress exposure. This suggests that CtsR plays a key role in general stress response in thermo-protection and in acid-tolerance. However it is difficult to affirm that CtsR plays a specific role in thermoprotection or acid-tolerance whether its inactivation leads to pleiotropic effects correlated with its obvious housekeeping function as central stress response regulator in *O. oeni*. Our data indicate that CtsR does not play an essential role in this adaptation process, but they highlight a crucial involvement to cope with prolonged heat stress. The *ctsR* inhibition conferred a heat-sensitive phenotype to the recombinant strain. In most Gram positive bacteria described so far, *ctsR* deletions lead to an increase in heat resistance and general stress tolerance (Nair et al. 2000; Chastanet et al. 2001; Karatzas and Bennik 2002; Hüfner et al. 2007; Zotta et al. 2009). This unexpected finding have already met in *L. plantarum* and could be explained by the fact that the inactivation of *ctsR* causes derepression of *hsp* genes preparing cells to cope with stressful conditions (Fiocco et al. 2010). We can hypothesize that the resulting overexpression of Lo18 could cause this phenotype by destabilization of membrane integrity. Due to the overlapping of genes *ctsR* and *clpC*, we can assume that *ctsR* asRNA could interfere with *clpC* expression and could be partly responsible for the observed phenotype. We have also begun to unravel the mechanism regulating the activity of CtsR by using *B. subtilis* as heterologous host. The thermoinduction test highlighted CtsR can be inactivated in a

temperature-dependent way. As previously suggested by Derr   et al. (1999b) and confirmed in *L. lactis*, *G. stearothermophilus* and *B. subtilis* by Elsholz et al. (2010), the *O. oeni* CtsR is an *in vivo* intrinsic heat sensor with specific temperature threshold according to the bacterial species (Elsholz et al. 2010). While in the CtsR-dependent gene expression has been shown to be de-repressed already at 42  C by *L. lactis* CtsR and still be repressed at 50  C by *G. stearothermophilus* (Elsholz et al. 2010), the CtsR-dependent gene expression was de-repressed from 35  C by the *O. oeni* CtsR in our model. It acts as a molecular thermometer having temperature threshold lower than 33  C. This seems to explain why previous complementation experiments performed at 37  C were insuccesfull (Grandvalet et al. 2005). This thermosensing ability is well-known in various macromolecules and proteins (Schumann 2009) and highly described in bacterial transcriptional repressor that bind DNA (Servant and Mazodier 1996; Derr   et al. 1999b; Servant et al. 2000; Elsholz et al. 2011a; Porrini et al. 2014; Roncarati et al. 2014). However, these DNA-binding regulators are poorly conserved. In contrast, CtsR sequences are highly conserved across the phylogenetic group of low GC, Gram-positive bacteria. If the HTH domain and the winged HTH domain have been identified to be conserved and crucial for CtsR activity, differences exist regarding to the actual residues involved in the thermo-sensor activity of the regulator. Indeed, it was assumed by Derr   et al. (2000) that both points of mutation V16M and G65S prevent the heat- inactivation of CtsR *in vitro*. In contrast, similar mutation seem to have no effects on CtsR activity *in vivo* (Supplementary Figure S6, Elsholz et al. 2010). Authors reported that the Glycine residue 64 at the tip of hairpin in highly conserved glycine-rich loop of the winged HTH domain is essential for *B. subtilis* CtsR activity *in vivo* and is responsible for thermosensing ability in several low GC Gram positive CtsR (Fuhrmann et al. 2009; Elsholz et al. 2010). We can hypothesize that variations in the conserved sequence of glycine-rich loop could explain temperature species-specific threshold. A piezotolerant strain of *Listeria monocytogenes* showed a resistant phenotype to heat, acid and oxidative treatments attributing to a single codon deletion in this conserved glycine-rich hairpin of the *ctsR* gene (Karatzas and Bennik 2002; Karatzas et al. 2003). Nevertheless, while this glycine-rich domain seems to be responsible for the CtsR thermosensibility, it does not seem to be involved in the temperature-specific activity of the regulator. Indeed, the alignment of sequences glycine-rich domain from firmicutes has shown a highly conserved sequence regardless the thermosensibility of the bacteria (data not shown). Because of the highly conservation of the CtsR peptidic sequence through the phylum of firmicutes, it is difficult to explain the phenomenon of specie-dependent heat

sensitivity. We can hypothesize the involvement of either the dimerization domain or the HTH domain in the regulation of CtsR activity.

In summary, our results confirmed *in vivo* the central involvement of CtsR in stress response of *O. oeni* as already begun with *B. subtilis* as heterologous host in previous laboratory study (Grandvalet et al. 2005). In addition, the modulation of *ctsR* gene affected the survival abilities under stress conditions in *O. oeni* ATCC BAA-1163 confirming the master coordinator role in general stress response.

Perspectives

This work needs to be supplemented by further investigations at different expression levels. The transcriptional pattern of putative CtsR regulon genes will have to be examined in the *O. oeni* recombinant strain by quantitative RT-PCR to demonstrate *in vivo* the involvement of the repressor CtsR in stress gene regulation: *clpP-clpL1*, *clpL2*, *grpE-dnaK-cbpA*, *groESL*, *hsp18* and *ctsR-clpC*. The asRNA approach need to be deepened by the detection of the asRNA targeting the *ctsR* messenger and the detection of the Clp and CtsR protein levels to validate the expression inhibition by this technic as already down in previous study for the *hsp18* gene in *O. oeni* (Darsonval et al. 2015).

To further consider the identification of the molecular players involved in the regulation of *O. oeni* CtsR, we planned to study the interaction protein-protein between CtsR and with other candidate genes that could have a role comparable to *mcsA/B* in the regulation of CtsR in *O. oeni* such as the *clpL* versions or *clpC*. The BACTH system (Bacterial Adenylate Cyclase Two-hybrid System) a bacterial two-hybrid technic is an approach used to detect and characterize protein-protein interactions *in vivo* based on the reconstitution of the adenylate cyclase (*cyaA* from *Bordetella pertussis*) activity in *E. coli*. All the constructions are available and ready to be tested by β -galactosidase assays.

References

- Assad-García J, Bonnin-Jusserand M, Garmyn D, Guzzo J, Alexandre H, Grandvalet C (2008) An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Lett Appl Microbiol* 47:333–338.
- Bartowsky EJ, Borneman AR (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:441–447.
- Beltramo C, Grandvalet C, Pierre F, Guzzo J (2004) Evidence for Multiple Levels of Regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL Locus Expression in Response to Stress. *J Bacteriol* 186:2200–2205.doi: 10.1128/JB.186.7.2200-2205.2003.
- Chastanet A, Fert J, Msadek T (2003) Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 47:1061–1073.
- Chastanet A, Msadek T (2003) ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 185:683–687.
- Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* clp genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* 183:7295–7307. doi: 10.1128/JB.183.24.7295-7307.2001
- Chu-Ky S, Tourdot-Maréchal R, Maréchal P-A, Guzzo J (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1717:118–124. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.09.015
- Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, 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 BBA-Biomembr* 1720:92–98. doi:10.1016/j.bbamem.2005.11.017.
- Darsonval M, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C (2015) The antisense RNA approach: a new application for in vivo stress response investigation in *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
- Da Silveira M g., Abee T (2009) Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *J Appl Microbiol* 106:1690–1696. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04136.x
- Da Silveira M g., Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, Abee T (2003) Membrane Fluidity Adjustments in Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* 69:5826–5832. doi: 10.1128/AEM.69.10.5826-5832.2003.
- Derr  I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T (1999a) ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 32:581–593.

- Derré I, Rapoport G, Msadek T (1999b) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 31:117–131.
- Derré I, Rapoport G, Msadek T (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol* 38:335–347.
- Elsholz AKW, Hempel K, Michalik S, Gronau K, Becher D, Hecker M, Gerth U (2011) Activity Control of the ClpC Adaptor McsB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193:3887–3893. doi:10.1128/JB.00079-11.
- Elsholz AKW, Michalik S, Zühlke D, Hecker M, Gerth U (2010) CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO J* 29:3621–3629. doi:10.1038/emboj.2010.228.
- Fiocco D, Capozzi V, Collins M, Gallone A, Hols P, Guzzo J, Weidmann S, Rieu A, Msadek T, Spano G (2010) Characterization of the CtsR Stress Response Regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 192:896–900. doi: 10.1128/JB.01122-09.
- Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 63:1285–1295. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x.
- Fuhrmann J, Schmidt A, Spiess S, Lehner A, Turgay K, Mechtler K, Charpentier E, Clausen T (2009) McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* 324:1323–1327. doi: 10.1126/science.1170088.
- Gerth U, Krüger E, Derré I, Msadek T, Hecker M (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* 28:787–802. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00840.x.
- Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ziebandt A-K, Tischer K, Scharf C, Hacker J, Hecker M (2000) Characterization of the σ B Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:6983–6991.
- Grandvalet C, Assad-García JS, 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. doi: 10.1099/mic.0.2007/016238-0.
- Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, Guzzo J (2005) CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J Bacteriol* 187:5614–5623. doi: 10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005.
- Guérout-Fleury A-M, Frandsen N, Stragier P (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180:57–61. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00404-0.
- Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin M-P, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin J-F, Diviès 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. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00042.x

- Hüfner E, Markieton T, Chaillou S, Coq A-MC-L, Zagorec M, Hertel C (2007) Identification of *Lactobacillus sakei* Genes Induced during Meat Fermentation and Their Role in Survival and Growth. *Appl Environ Microbiol* 73:2522–2531. doi: 10.1128/AEM.02396-06
- Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Diviès C, 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.
- Jobin M-P, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J (1999) The *Oenococcus oeni* clpX Homologue Is a Heat Shock Gene Preferentially Expressed in Exponential Growth Phase. *J Bacteriol* 181:6634–6641.
- Karatzas KAG, Bennik MHJ (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A Isolate with High Tolerance towards High Hydrostatic Pressure. *Appl Environ Microbiol* 68:3183–3189. doi: 10.1128/AEM.68.7.3183-3189.2002.
- Karatzas KAG, Wouters JA, Gahan CGM, Hill C, Abee T, Bennik MHJ (2003) The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol Microbiol* 49:1227–1238. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03636.x.
- Kirstein J, Dougan DA, Gerth U, Hecker M, Turgay K (2007) The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *EMBO J* 26:2061–2070. doi: 10.1038/sj.emboj.7601655.
- Kirstein J, Zühlke 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*. *EMBO J* 24:3435–3445. doi:10.1038/sj.emboj.7600780.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Law J, Buist G, Haandrikman A, Kok J, Venema G, Leenhouts K (1995) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol* 177:7011–7018.
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317–331.
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harb. Lab. Press
- Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud M-L, Denizot F, Rapoport G (1998) ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 27:899–914. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00735.x.
- Nair S, Derré I, Msadek T, Gaillot O, Berche P (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 35:800–811.
- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Volker U, Hecker M (2001) Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:5617–5631. doi: 10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001.
- Porrini L, Cybulski LE, Altabe SG, Mansilla MC, de Mendoza D (2014) Cerulenin inhibits unsaturated fatty acids synthesis in *Bacillus subtilis* by modifying the input signal of DesK thermosensor. *MicrobiologyOpen* 3:213–224. doi: 10.1002/mbo3.154.

- Roncarati D, Danielli A, Scarlato V (2014) The HrcA repressor is the thermosensor of the heat-shock regulatory circuit in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 92:910–920. doi:10.1111/mmi.12600.
- Salema M, Lolkema JS, San Romão MV, Lourero Dias MC (1996) The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J Bacteriol* 178:3127–3132.
- Schumann W (2009) Chapter 7 Temperature Sensors of Eubacteria. In: Allen I. Laskin SS and GMG (ed) *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp 213–256
- Servant P, Grandvalet C, Mazodier P (2000) The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3538–3543.
- Servant P, Mazodier P (1996) Heat induction of hsp18 gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation. *J Bacteriol* 178:7031–7036.
- Spano G, Massa S (2006) Environmental Stress Response in Wine Lactic Acid Bacteria: Beyond *Bacillus subtilis*. *Crit Rev Microbiol* 32:77–86. doi: 10.1080/10408410600709800.
- Taketo A (1988) DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta* 949:318–324.
- Tao L, Biswas I (2013) ClpL Is Required for Folding of CtsR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 195:576–584. doi: 10.1128/JB.01743-12.
- Tao L, Chattoraj P, Biswas I (2012) CtsR regulation in mcsAB-deficient Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 194:1361–1368. doi: 10.1128/JB.06746-11.
- Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Diviès C (2000) Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 55:269–273.
- Varmanen P, Ingmer H, Vogensen FK (2000) ctsR of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of clp gene expression. *Microbiol Read Engl* 146 (Pt 6):1447–1455.
- Varmanen P, Vogensen FK, Hammer K, Palva A, Ingmer H (2003) ClpE from *Lactococcus lactis* promotes repression of CtsR-dependent gene expression. *J Bacteriol* 185:5117–5124.
- Yuan G, Wong SL (1995) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* groE regulatory mutants: evidence for orf39 in the dnaK operon as a repressor gene in regulating the expression of both groE and dnaK. *J Bacteriol* 177:6462–6468.
- Zotta T, Asterinou K, Rossano R, Ricciardi A, Varcamonti M, Parente E (2009) Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *Int J Food Microbiol* 129:211–220. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.024

II. Etude de l'impact des gènes *estA2* et *estA7* de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin après FML

II.1. Introduction

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Institute for Wine Biotechnology (Université de Stellenbosch, Afrique du Sud) financée par un appel d'offre d'AgroSup Dijon (appel d'offre 2013), nous nous sommes intéressés à l'impact du métabolisme secondaire de *O. oeni* sur les propriétés aromatiques du vin. Bien qu'à l'heure actuelle, la FML soit recherchée dans la plupart des vins rouges et de plus en plus dans les vins blancs, il n'en fut pas toujours ainsi et l'impact de cette étape est encore trop souvent réduite à une diminution de l'acidité totale du vin. En parallèle de cette désacidification, *O. oeni* est capable d'apporter des changements significatifs à la composition aromatique du vin en libérant des molécules d'intérêt aromatique par l'intermédiaire de son métabolisme secondaire. Après le diacétyl, les esters, responsables des arômes fruités et floraux dans les vins jeunes, constituent l'une des plus importantes familles de composés aromatiques dans le vin. La majorité des esters présents dans le vin sont produits par les levures durant la FA (Lilly et al. 2006). Bien que de nombreuses études se soient focalisées sur l'activité estérase des levures (Saerens et al. 2006; Lilly et al. 2006), le potentiel de l'activité estérase des bactéries lactiques d'intérêt œnologique lors de la FML sur l'arôme du vin reste un domaine peu exploré.

Quatre gènes codant des estérases ont été décrits chez la souche *O. oeni* Ooeni28 commercialisée par Lallemant (nuovi Ceppi Oo2) et destinée à l'ensemencement des vins: *estA2*, *estA7*, *estC* et *estB*. La plupart des études réalisées ont été menées *in vitro* via la surexpression de ces gènes chez *E. coli* puis purification de la protéine. Ces études, menées dans le but de surproduire et purifier ces estérases afin de les ajouter au moût en cours de fermentation, décrivent les bactéries lactiques comme une source potentielle d'enzymes œnologiques. Cependant, de nos jours, la demande du consommateur s'oriente de plus en plus vers un produit dit « naturel » c'est-à-dire sans additifs synthétiques ce qui oblige les industriels à s'intéresser davantage aux propriétés et potentiels biotechnologiques des bactéries lactiques et autres microorganismes. Bartowsky et Borneman rapportent clairement que la variabilité génotypique des souches de *O. oeni* présente un réel intérêt en terme d'impact sur la FML et sur les composés aromatiques du vin (Bartowsky and Borneman 2011). Notre projet s'inscrivait dans cette dynamique et proposait de caractériser

l'impact aromatique du métabolisme de *O. oeni* en conditions œnologiques et d'établir l'influence de chacun des gènes *est* sur la flaveur du vin.

Cette étude proposait d'évaluer l'impact des deux estérases EstA2 et EstA7 de *O. oeni* sur les esters dans le vin. Notre stratégie consistait à surexprimer au cours de la FML chacun de ces gènes codant ces estérases à l'aide du nouvel outil d'expression que nous avons développé au laboratoire, le pSIPSYN. A partir de la séquence des gènes d'estérases de la souche Ooeni28, deux gènes codant des estérases putatives ont été identifiés dans le génome de la souche ATCC BAA-1163. Une analyse des séquences peptidiques a mis en évidence la présence des deux principaux motifs caractéristiques de la famille V des enzymes lipolytiques bactériennes : la triade catalytique [SDH/E] et la structure nucléophile en coude de type [GXSXG] entourant le résidu sérine du site actif (Cygler et al. 1993; Arpigny and Jaeger 1999). Après clonage dans le pSIPSYN, le dosage de l'activité estérase des souches *E. coli* recombinantes a permis de vérifier la fonctionnalité des gènes clonés. Après cette validation, les vecteurs recombinants ont été transférés chez *O. oeni* au même titre que le vecteur pSIPSYN natif. La caractérisation des souches recombinantes a montré pour la 1^{ère} fois chez *O. oeni* l'expression de gènes fonctionnels codant des protéines dont l'activité enzymatique a pu être quantifiée. Les souches recombinantes de *O. oeni* ont été inoculées dans un vin de cépage Aligoté pour effectuer la FML. Après FML, le profil d'esters des vins expérimentaux a été établi par GC-MS SPME (technique de microextraction sur phase solide associée à une méthode d'analyse de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) et les esters, substrats des estérases étudiées ont été identifiés et quantifiés. Notre étude suggère que l'estérase EstA2 possède une activité majoritairement hydrolytique sur les acétates d'esters issus d'alcools supérieurs avec une préférence pour les chaînes courtes d'acides gras (C4-C6). L'estérase EstA7 a une activité de synthèse sur l'acétate d'hexyle en augmentant significativement de 22,7% la concentration de l'ester. Notre étude a été rendue possible grâce à la mise au point du 1^{er} vecteur d'expression, efficace et fiable chez *O. oeni*. Ce vecteur ouvre un champ de possibilité pour l'étude des gènes impliqués dans la modulation du profil aromatique du vin lors de la FML. Le niveau d'expression des gènes *estA2* et *estA7* pourrait être utilisé comme application directe à l'élaboration des futurs ferments malolactiques.

Cette étude ont fait l'objet de deux communication orales, l'une lors du congrès internationale MACROWINE2014 à Stellenbosch (Afrique du Sud, 4 au 7 septembre 2014) et l'autre lors du 10^{ème} Symposium internationale d'œnologie de Bordeaux (30 juin au 2 Juillet 2015). Les résultats de ce travail sont présentés sous forme d'article et soumis en octobre 2015 au journal Food Microbiology.

II.2. **Article III**

TITLE: “Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of *estA2* and *estA7* esterase genes on wine ester profile”

Short title: Impact of *O. oeni* esterase genes *estA2* and *estA7* on wine aromatic profile

Authors: ¹M. Darsonval, ¹H. Alexandre, ¹C. Grandvalet.

¹UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress (VALMiS), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France.

Corresponding author: Cosette Grandvalet, Université de Bourgogne – IUVV Jules Guyot, Equipe VALMiS, 1, rue Claude Ladrey - Campus Montmuzard, B.P.27877 - 21078 Dijon, France, e-mail: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr, 03-80-39-62-66.

Key-words: *O. oeni*, esters, EstA7, EstA2, ester profile, GC-MS-SPME

Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of *estA2* and *estA7* esterase genes on wine ester profile

¹Maud Darsonval, ¹Hervé Alexandre, ^{1,2}Cosette Grandvalet.

¹UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM), Equipe Vin, Aliment, Microbiologie, Stress(VALMiS), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France,

² AgroSup Dijon, Institut national supérieur des sciences agronomiques, de l'alimentation et de l'environnement, Dijon, France.

Key-words: *Oenococcus oeni*, recombinant strains, EstA7, EstA2, ester profile, SPME-GC-MS

To whom correspondence should be addressed : Cosette Grandvalet, Université de Bourgogne – IUVV Jules Guyot, Equipe VALMiS, 1, rue Claude Ladrey - Campus Montmuzard, B.P.27877 - 21078 Dijon, France, e-mail: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr, 03-80-39-62-66.

ABSTRACT

Besides deacidifying wine, *Oenococcus oeni* bring significant changes in the chemical composition of wine by releasing esters by the action of their own esterases. The impact of *O. oeni* esterases remains relatively unexplored. Four esterase genes were identified from *O. oeni* genome (*estA2*, *estA7*, *estC*, and *estB*). The dual objective of this study was, first to use a genetic tool enabling the expression of esterase genes in enological conditions and, second, to investigate the impact of *O. oeni* esterase gene expression during winemaking on wine aromatic profile. Both *estA2* and *estA7* genes were successfully cloned and expressed in *O. oeni* and recombinant strains were inoculated in Aligoté wine to initiate malolactic fermentation (MLF). Ester profile of experimental wine was established by SPME-GC-MS. EstA2 caused significant decreases in the concentrations of isoamyl acetate, ethyl hexanoate, isobutyl acetate, and hexyl acetate, by 42.7%, 23.4%, 51.5%, and 28.9%, respectively. EstA2 has preferential hydrolytic activity toward acetate esters from higher alcohols. EstA7 has synthetic activity toward hexyl acetate with a significant 22.7% increase. This study reports the first efficient expression system enabling the production of a functional protein in *O. oeni* in enological conditions.

1. Introduction

During winemaking, malolactic fermentation (MLF) is typically undertaken by four genera of Lactic Acid Bacteria (LAB): *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Oenococcus*. Usually the MLF function is limited to wine deacidification; however, numerous studies found that LAB bring significant changes in wine aroma and improve its organoleptic qualities (Bartowsky, 2005; Delaquis et al., 2000; Maicas et al., 1999; Pozo-Bayón et al., 2005; Ugliano and Moio, 2005). Despite a large microbial diversity present in grape must, it is mainly *Oenococcus oeni* that provides this step and represents the majority of malolactic ferments commercialized (Bartowsky and Borneman, 2011; Lonvaud-Funel, 1999). *O. oeni* is acidophilic and indigenous to wine LAB (Lonvaud-Funel, 1999). *O. oeni* has an extensive range of metabolic pathways and enzymes responsible for the liberation of volatile secondary compounds contributing to the aromatic quality of wine (Bartowsky, 2005; Siebert et al., 2005). Although the six fully assembled genome sequences (Capozzi et al., 2014; Lamontanara et al., 2014; Makarova et al., 2006) and 60 scaffold genomes of *O. oeni* strains are now available on databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), knowledge of *O. oeni* genes and their potential impact on wine aroma is limited.

Current research is providing a new opportunity to alter the aromatic properties of wine and flavor perception by highlighting the potential impact of bacteria on components and sensory properties of wine (Bartowsky and Borneman, 2011; Matthews et al., 2004). *alsS*, *alsD*, *citE*, and *ackA* are partially characterized and described as being responsible for diacetyl production, the most important flavor molecule produced by *O. oeni* during MLF (Olguín et al., 2010, 2009). Concerning other flavor-related genes of *O. oeni* involved in the aromatic profile of wine, such as esterases, β -glucosidase, proteases, peptidases, or phenolic acid decarboxylase, it remains a relatively unexplored field (de las Rivas et al., 2009; Mesas et al., 2012; Michlmayr and Kneifel, 2013; Sumby et al., 2010). Understanding and characterizing LAB aroma-related genes are required for fundamental perspectives and to open up the field to enological applications using LAB. Besides diacetyl compounds, *O. oeni* can metabolize precursors present in wine during MLF to form esters and can alter the chemical composition of wine. Esters are quantitatively the most important families of aromatic compounds in wine. The majority of wine esters are produced by yeasts during alcoholic fermentation (AF). However, esters can also be derived from LAB metabolism, from grapes, and from aging of wine by chemical esterification of alcohols and

acids (Bartowsky, 2005; Lilly et al., 2006; Pozo-Bayón et al., 2005; Swiegers et al., 2005). Considering the large number of acids and alcohols presents in wine, a wide range of esters can be formed during the winemaking process. Wine esters are mainly C₄–C₁₀ ethyl esters of organic acids, acetate esters of higher alcohols, or ethyl esters of straight-chain fatty acids and are, if not exclusively, mainly responsible for the fruity aroma of young wine (Ebeler, 2001; Sumby et al., 2010). Most esters are found in trace amounts in the final product at concentrations below the detection limit. Nevertheless, while esters are present in small quantities in wine, they are involved in the aromatic complexity of wine, and a small change in concentration can have a dramatic effect on the aromatic profile of wine (Aznar and Arroyo, 2007; Ferreira et al., 2000). Since the 1980s, several studies have noticed increases and decreases in ethyl ester concentrations in wine following MLF, including in attractive aromatic compounds such as ethyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl lactate, and ethyl octanoate (Delaquis et al., 2000; de Revel et al., 1999; Gámbaro et al., 2001). The variation of ester concentrations during winemaking suggests the involvement of esterases in both the hydrolysis and synthesis of esters. For this purpose, a better understanding of the mechanisms of ester synthesis and hydrolysis in wine is essential to develop new MLFs through an improvement of strain selection based on their esterase abilities. Most studies have focused on the esterase activity of yeasts (Lilly et al., 2006; Saerens et al., 2006), and the esterase activity of wine-related LAB during MLF remains relatively unexplored. Studies of LAB esterases have been conducted mostly on dairy-related LAB strains (Esteban-Torres et al., 2014; Fenster et al., 2003; Fernández et al., 2000). Previous studies have already characterized esterase enzymes from *O. oeni* and other LAB strains of enological interest isolated from wine: *Lactobacillus* and *Pediococcus* (Davis et al., 1988; Matthews et al., 2007, 2004; Sumby et al., 2013, 2012a, 2009). Currently, four genes encoding esterases have been described in Ooeni28 an *O. oeni* strain commercialized by Lallemend (Montreal, Canada): *estA2*, *estA7*, *estC* and *estB*.

Previous studies have shown that purified *O. oeni* esterases, EstCOo8, EstC34, and EstB28, have a preference for short-chain synthetic substrates such as *p*-nitrophenyl butanoate (*p*NP-butanoate) or *p*NP-acetate and are capable of esterase activity in wine-like conditions relevant to winemaking at pH 3.5 and in the presence of ethanol (13%) (Sumby et al., 2012a, 2010, 2009). Further investigations of EstA2 and EstB28 have suggested a possible dual activity of hydrolysis and synthesis on natural substrates (Sumby et al., 2013). Nevertheless, this dual

activity observed *in vitro* with purified esterases cannot be extrapolated to wine medium and further investigation is needed. Moreover, the role of this dual activity on wine-related esters is still unknown and therefore not yet understood in wine. At this point, the characterization of *O. oeni* esterases in wine conditions has not yet been reported. Due to the obvious lack of genetic expression tools in *O. oeni*, no study has been performed precisely to investigate the ability of *O. oeni* esterases to affect ester substrates in wine regarding their level of expression. Recently, we provided a new efficient expression tool, the pSIPSYN vector, to produce for the first time antisense RNA for modulating gene expression (Darsonval et al., 2015). In this study, recombinant vectors derived from pSIPSYN were constructed to express *estA2* and *estA7* genes in *O. oeni* and to assess the impact of the expression of this two esterases genes on wine-ester profiles during winemaking. The novel biotechnological expression system was assessed by assay of enzymatic activity on a synthetic substrate, *p*NP-butanoate. *O. oeni* recombinant strains exhibiting higher esterase activity were used to inoculate an Aligoté wine. The flavor profile of experimental wines was established by solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME-GC-MS), and ester substrates of the studied esterases were thus identified.

2. Materials and methods

2.1. Strain, growth media, and transformation conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *O. oeni* strain ATCC BAA-1163 is an acidophilic strain, isolated from red wine. *O. oeni* were grown at 30°C in FT80 medium (pH 5.3) (Cavin et al., 1989). In preparation for the experiments, *O. oeni* were precultured from glycerol medium stored at -80°C in FT80 medium supplemented with 20 µg.ml⁻¹ of vancomycin, 20 µg.ml⁻¹ of lincomycin, and 20 µg.ml⁻¹ of erythromycin when necessary. Cultures used in assays of esterase activity were inoculated from the precultures and incubated for 20 h at 30°C. For enzymatic assays, cellular extracts were prepared from *O. oeni* grown to the mid-exponential phase (OD_{600nm} = 0.8). *Escherichia coli* K12 strain GM2163 was used as a host strain for the cloning and maintenance of plasmids. For cloning experiments, *E. coli* were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with erythromycin when necessary (250 µg.ml⁻¹). *E. coli* GM2163 were transformed by electroporation with a ligation mixture (Taketo, 1988).

Positives clones were selected on LB plates supplemented with erythromycin (250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Electroporation was also used to transform *O. oeni* as previously described (Assad-García et al., 2008), with selection on FT80 plates supplemented with erythromycin, vancomycin, and lincomycin (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ each). The presence of plasmids was verified by colony-PCR amplification with primer pairs matching the plasmid sequence, Olcg303/Olcg302, Olcg303/estA2E, or Olcg303/estA7E. The presence of the vector pSIPSYN does not modify the growth parameters of engineered strains.

Table 1: Details of the strains used in this study

Strains	Genotypes/Descriptions	Sources
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> K12 <i>F</i> ⁻ <i>ara</i> -14 <i>leu</i> B6 <i>fhu</i> A31 <i>lac</i> Y1tsx78 <i>gln</i> V44 <i>galk</i> 2 <i>gal</i> t22 <i>mcr</i> A	Thermo Fisher
GM2163	<i>dcm</i> -6 <i>his</i> G4 <i>rfb</i> D1 <i>rps</i> L136 <i>dam</i> 13::Tn9 <i>xyl</i> A5 <i>mtl</i> -1 <i>thi</i> -1 <i>mcr</i> B1.	
EcestA2	GM2163 derivative harboring pSIPSYNestA2, ery ^R	This study
EcestA7	GM2163 derivative harboring pSIPSYNestA7, ery ^R	This study
Ecsyn	GM2163 derivative harboring pSIPSYN, ery ^R	This study
<i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163	wild type strain, van ^R	Laboratory stock
OoestA2	ATCC BAA-1163 derivative harboring pSIPSYNestA2, van ^R , ery ^R , linco ^R	This study
OoestA7	ATCC BAA-1163 derivative harboring pSIPSYNestA7, van ^R , ery ^R , linco ^R	This study
Oosyn	ATCC BAA-1163 derivative harboring pSIPSYN, van ^R , ery ^R , linco ^R	Darsonval et al., 2015
Plasmids	Characteristics	Sources
pSIPSYN	ery ^R , linco ^R , derived from pSIP409, deletion of <i>sppK</i> , <i>sppR</i> , carrying <i>gusA</i> under the control of P _{SYN} promoter	Darsonval et al., 2015
pSIPSYNestA2	ery ^R , linco ^R , derived from pSIPSYN, carrying <i>estA2</i> under the control of P _{SYN} promoter	This study
pSIPSYNestA7	ery ^R , linco ^R , derived from pSIPSYN carrying <i>estA7</i> under the control of P _{SYN} promoter	This study

* van^R: vancomycin resistance, ery^R: erythromycin resistance and linco^R: lincomycin resistance.

2.2. DNA isolation and manipulation

Isolation of DNA from *O. oeni* was achieved using an InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primers targeting the open reading frame (ORF) of the *O. oeni* esterase genes were purchased from Eurogentec (Li  ge, Belgium) and were designed based on the published *O. oeni* ATCC BAA-1163 genome sequence (AAUV000000000) (Table 2). PCR was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) according to the parameters accompanying the polymerase. Plasmids from *E. coli* were prepared with a GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the protocol provided by the manufacturer. DNA fragments were purified with a GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). T4 DNA ligase and other restriction endonucleases were purchased from New England Biolabs Inc. (New England Biolabs,

Ipswich, MA, USA) and were used as recommended by the manufacturer for the cloning experiments. Plasmids pSIPSYNestA2 and pSIPSYNestA7 were constructed by inserting the amplified *estA2* and *estA7* esterase ORFs into the multiple cloning sites of the *E. coli*/LAB shuttle vector pSIPSYN (Darsonval et al., 2015) under the control of a synthetic constitutive promotor. The ORFs of *estA2* and *estA7* were amplified by PCR by using primer couples *estA2N/estA2E* and *estA7N/estA7E* respectively (Table 2). Resulting fragments were cloned between *NcoI* and *EcoRI* restriction sites of pSIPSYN to obtain pSIPSYNestA2 and pSIPSYNestA7.

Table 2: Primers used in this study

Gene-region	Primer	Primer sequence (5'-3')*	Restriction site
<i>estA2</i>	<i>estA2N</i>	CGCATG CCATGG CTTTTTTACAAATAAAATTATC	<i>NcoI</i>
	<i>estA2E</i>	CCGGAAT CTTAT GATAGACGTTCTTCTTTAAT	<i>EcoRI</i>
<i>estA7</i>	<i>estA7N</i>	CGCATG CCATGG CATTTTTAGAAAGTTAATTATT	<i>NcoI</i>
	<i>estA7E</i>	CGGGAAT CTAT GACAAACGTTTTTCTGCT	<i>EcoRI</i>
P _{SYN}	Olcg302	ggg CCATgg CAAATACCTCCTGATTCATTAATGCAGGGGTAC	<i>NcoI</i>
	Olcg303	CCCAAG CTT GCGCAACTGTTGGGAAGGG	<i>HindIII</i>

* Restriction sites are underlined, start and stop codons are indicated in bold.

2.3. DNA sequencing and sequence analysis

The sequences of both strands of esterase genes cloned into pSIPSYN were confirmed by nucleotide sequencing, with labeling and capillary separation on an AB3730xl performed by Beckman Coulter Genomics. The *olcg303* and *estA2E* or *estA7E* primers were used for this purpose. Nucleotide sequencing results were analyzed using LALIGN software (www.ch.embnet.org/software/LALIGN) and sequence alignments were performed using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and Boxshade software (<http://www.ch.embnet.org/software/BOXform.html>).

2.4. Determination and characterization of esterase activity

Esterase assays were conducted using *pNP*-butanoate as a substrate based on the protocol of Matthews et al., (2007). Cellular extracts were harvested from 25 ml cultures collected by centrifugation at 6500g for 5 min at room temperature. Cell pellets were transferred in 800 µl of 1× PBS (phosphate-buffered saline, Biosolve, Dieuze, France: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and lysed twice with Precellys action (60 s–20 s–60 s at 6500g; Paris, France). Reaction mixtures (final volume 1 ml) were prepared by mixing 760 µl

of reaction buffer (0.1 M K_2HPO_4 , 0.2 M citric acid, pH 5, 0.1% gum arabic, 0.005% Triton X-100), 200 μ l of supernatant of cellular extract (volume of cellular extract was adjusted according to sample activity) and then incubated at 37°C for 5 min to stabilize the reaction temperature. Reaction was triggered by adding *p*NP-butanoate (25 mM in absolute ethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then incubated for 1 h (time of reaction was adjusted according to sample activity). The reaction was stopped by adding 50 μ l of NaOH (0.5 M). The released *p*-nitrophenol was quantified by measuring the absorbance at 410 nm using a SmartSpec Plus Spectrophotometer (Bio-Rad). Total cellular proteins in supernatants were assayed using a Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate based on the Bradford method according to the manufacturer's recommendations. Specific activities were calculated and then corrected for non-enzymatic degradation of the ester substrate using an enzyme-free control with the same reaction mixture. The data were also corrected for nonspecific degradation of the ester substrate using the native-vector strain with the same reaction mixture. All assays and controls were treated in the same manner and conducted in triplicate.

2.5. Malolactic fermentation trials and analysis of volatiles

MLF trials were conducted to determine the ester profile of wine of each experimental condition. An Aligoté wine (pH 3.1, 3.2 g.l⁻¹ malic acid, 11.8% ethanol) sourced from the winery of Burgundy University (Marsannay-la-Côte, France) was used in this study. Wine was collected after FA and was adjusted at pH 3.5 with KOH (1 N, VWR BDH Prolabo, Radnor, PA, USA) and then filtered through a 0.22 μ m filter (Millipore, Darmstadt, Germany) to eliminate the endogenous flora. Wine was aliquoted into 12 $\times$ 100 ml bottles. To start MLF, wine was inoculated in triplicate with the three recombinant strains at 10⁵ cells.ml⁻¹ and incubated at 22°C without agitation. Malic acid concentration was monitored using a spectrophotometric enzyme analysis kit (Biosentec, Auzeville Tolosane, France). MLF was considered to be complete when the concentration of malic acid was $\leq$ 0.2 g.l⁻¹. At the completion of MLF, samples were treated with sulfur dioxide at 30 mg.l⁻¹ and were divided in 50 ml tubes. Tubes were closed under an atmosphere of nitrogen and stored at -20°C to avoid any changes in ester concentration. All samples were analyzed within one month. After MLF, resulting wines were analyzed by SPME-GC-MS to quantify and identify esters released during MLF and establish their flavor profile. The assay was performed as described by Sumby et al. (2013) with some modifications. Briefly,

the length of the 50/30 μm Carboxen–divinylbenzene–polydimethylsiloxane fiber used was 2 cm. The internal control was ethyl heptanoate used at 85 $\mu\text{g.l}^{-1}$. SPME fiber was desorbed in a spitless mode. The volatile compounds identified and quantified were compared to the concentrations of known standards, which had been prepared in ethanol. The peaks were assigned by comparison to the ratio of the peak area of the standard peak area (m/z). For each measurement, the peak area was calculated and converted to concentration using a least squares regression method.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Microsoft Office XLSTAT-Pro version 7.5.2. The confidence interval was $p \leq 0.05$. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the concentrations of each wine ester from each recombinant strain of *O. oeni* ATCC BAA-1163. The significance of the differences among esterase activity values was determined with an unilateral and paired *t* tests. The confidence interval for a difference in the means was set at 95% ($P \leq 0.05$) for all comparisons.

2.7. Sequences

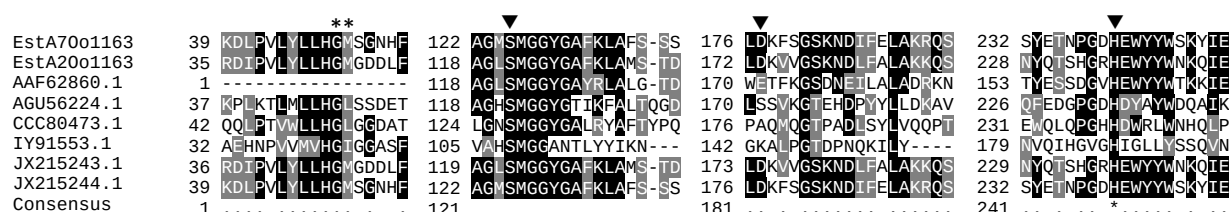
Sequence alignments were performed with the following sequences: KT454793 (tributylin esterase EstA2, *O. oeni* ATCC BAA-1163), EAV39250.1 (tributylin esterase EstA7, *O. oeni* ATCC BAA-1163), AAF62860.1 (tributylin esterase EstA, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (Fernández et al., 2000)), AGU56224.1 (tributylin esterase EstA, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 6850 (Fraunholz et al., 2013)), CCC80473.1 (acetyl esterase EstA, *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Siezen et al., 2012)), AIY92125.1 (esterase EstA, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (Barbe et al., 2009), JX215243.1 (esterase EstA2, *O. oeni* Oeni28, Sumby K.M., unpublished data, direct submission) and JX215244.1 (putative esterase EstA7, *O. oeni* Oeni28, Sumby K.M., unpublished data, direct submission).

3. Results

3.1. Sequence analysis

Based on the sequence of *O. oeni* Oeni28 *estA2* (JX215243.1) and *estA7* (JX215244) genes (Sumby et al., 2013) (Lallemand, nuovi Ceppi OO2, (Matthews et al., 2006), two higher similar

ORFs were identified from *O. oeni* ATCC BAA-1163 strain. These two putative genes were subsequently called by homology: *estA2* (KT454793) and *estA7* (EAV39250.1). The ORF *estA2* consisted in 792 bp encoding a deduced protein of 263 amino acids. The ORF *estA7* consisted in 804 bp encoding a deduced protein of 268 amino acids. Both putative peptide sequences deduced from the nucleotide sequences were aligned to the sequences of *O. oeni* Ooeni28 esterases. The *O. oeni* ATCC BAA-1163 *estA2* sequence exhibits 8 nucleotide substitutions and 2 nucleotide insertions compared with *O. oeni28 estA2* sequence, resulting in four amino acid substitutions and one amino acid insertion (97.4 % aa identity). By contrast, the nucleotide sequence of *O. oeni* ATCC BAA-1163 *estA7* was 100% identical to those of *O. oeni* Ooeni28 *estA7*. The deduced amino acid sequences of EstA2 and EstA7 from *O. oeni* ATCC BAA-1163 strain were analyzed for key lipolytic enzyme motifs and were compared with other known and predicted esterase sequences available from GenBank (NCBI database). Based on these alignments, the putative catalytic triad formed by three residues, SDH/E, was identified in both esterases studied (Fig 1). The putative nucleophilic elbow structural motif GX SXG surrounding the active-site serine residue was also identified, showing that both esterases belong to family V bacterial lipolytic enzymes (Arpigny and Jaeger, 1999). The putative GX motif, possibly an oxyanion hole, was also identified with this alignment.



sequencing, *E. coli* recombinant strains carrying native pSIPSYN vector (Ecsyn, control) or recombinant vector pSIPSYNestA2 and pSIPSYNestA7 (EcestA2 and EcestA7) were used to test the functionality of cloned esterase genes. Enzymatic activity was assayed using the synthetic substrate *p*NP-butanoate and cells were extracted from *E. coli* recombinant strains in exponential growth phase (See Materials and methods section). The esterase activity was normalized to the basal esterase activity of a strain carrying native pSIPSYN plasmid (Ecsyn). Both recombinant *E. coli* strains, EcestA2 and EcestA7 have relative esterase activity significantly 4.93-fold and 5.74-fold higher than Ecsyn (control strain) respectively (Fig 2A). Having established that the recombinant *E. coli* strains, EcestA2 and EcestA7 have an esterase activity significantly increased in recombinant *E. coli* strains compared to the control strain (Ecsyn), plasmids pSIPSYNestA2 and pSIPSYNestA7 were transferred into *O. oeni* ATCC BAA-1163 (OoestA2 and OoestA7) using pSIPSYN as a control (Oosyn, control strain). Once the presence of plasmids in *O. oeni* was confirmed by PCR, esterase activity assays were conducted on the recombinant strains of *O. oeni* ATCC BAA-1163 as previously performed in *E. coli* (Fig 2B). Both recombinant *O. oeni* strains, OoestA2 and OoestA7 have relative esterase activity significantly 5.80-fold and 12.83-fold higher than control strain (Oosyn).

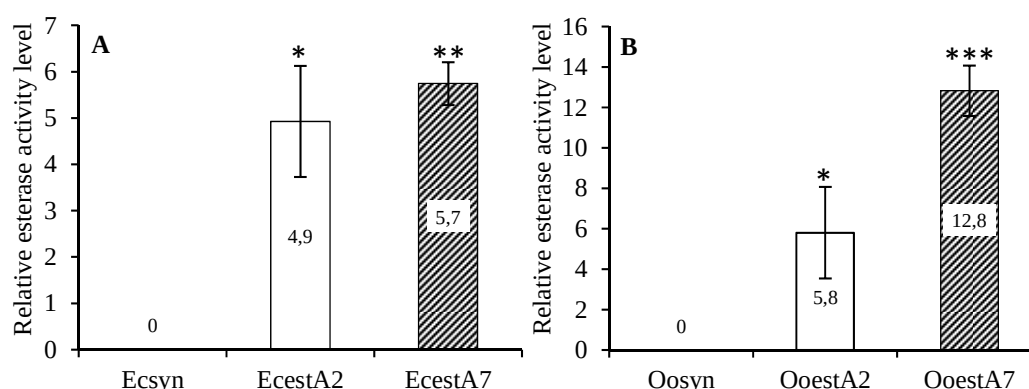


Fig 2: Relative esterase activity level in *E. coli* (A) and *O. oeni* (B) engineered strains. Cells were grown in LB medium at 37°C (*E. coli*) or in FT80 medium (*O. oeni*) until exponential growth phase. Enzyme activity was determined with cellular extract at 37°C on the synthetic substrate *p*NP-butanoate. Values are the means of triplicates $\pm$ standard deviations. Values are shown relative to the basal activity detected in strains carrying native plasmide (Ecsyn and Oosyn), which was arbitrarily designated 0. Significant differences are based on unilateral and paired *t* tests. *, $P \leq 0.0005$; **, $P \leq 0.005$; *, $P \leq 0.05$.**

3.3. Impact of increased esterase activity on wine ester profiles

Having confirmed that both recombinant *O. oeni* strains had a significant detectable increased esterase activity compared with the activity of control strain, further investigations were

performed in wine. To determine whether the esterase gene might be responsible for a particular profile, MLFs of wine from the Aligoté grape variety were conducted to assess esterase-specific changes in ester concentration. Different ethyl and acetate esters were identified and quantified by SPME-GC-MS. An ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test was conducted to determine significant changes in wine ester composition. Table 3 and Fig 3 present the means of the ester concentrations quantified in the wine before and after the MLF step. An inoculated wine was analyzed to provide a control. First, our analysis indicates that MLF triggered changes in the ester composition of wines with the three *O. oeni* recombinant strains. As expected, the greatest increase in concentration during the MLF was found for ethyl lactate. The concentration of this compound was doubled by the three recombinant strains studied relative to not inoculated condition, but did not exceed the aroma threshold of 150,000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Sumbly et al., 2013). The quantification of this ester confirmed the fermentative abilities of *O. oeni* ATCC BAA-1163, a laboratory strain isolated from red wine in the 1980s (Maicas et al., 1999).

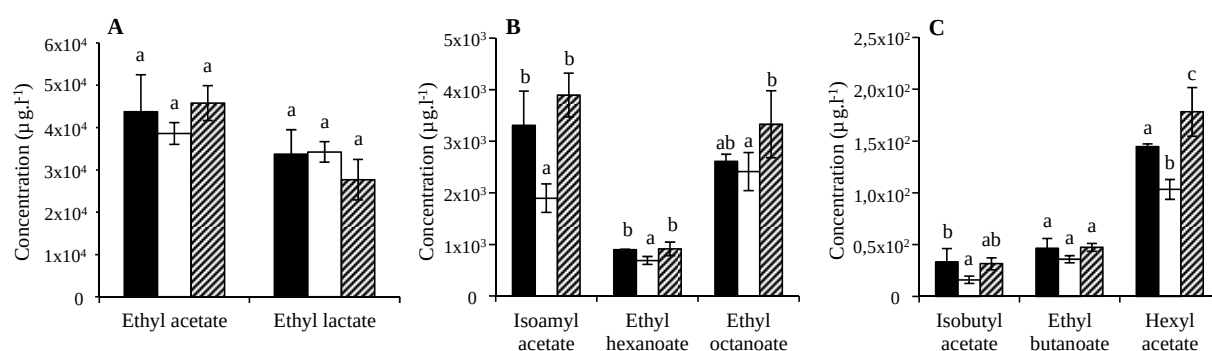


Fig 3: Ester concentrations in fermented Aligoté wine inoculated with *O. oeni* ATCC BAA-1163 Oosyn strain in black, OoestA2 strain in white and OoestA7 strain in black hatching. Significant differences are based on One-way analysis of variance Tukey’s Multiple Test ($P \leq 0.05$).

After the MLF step by the OoestA2 strain, besides the increase in ethyl lactate concentration, only decreases in the concentrations of other esters were observed (Fig 3A). The concentration of isoamyl acetate (banana and pear aromas), ethyl hexanoate (green apple aroma), isobutyl acetate (fruity aromas) and hexyl acetate (pear aroma) were all significantly and respectively decreased by 42.7%, 23.4%, 51.5%, and 28.9% compared with the control strain (Oosyn strain) Fig 3B, C). Changes in ester concentrations of isobutyl acetate and hexyl acetate were below the aroma threshold reported in wine (Table 3). Following the MLF by the OoestA7 strain, the major significant change in ester concentration noted was a 22.7% increase in hexyl acetate compare to control strain (Oosyn). No decrease was observed after MLF with the OoestA7 strain. Change in

hexyl acetate concentration was also below the threshold reported in wine (Table 3). Other ester concentrations monitored, including ethyl acetate (fruity), ethyl octanoate (ripe fruit), and ethyl butanoate (strawberry), showed no significant changes (Fig 3).

Table 3: Concentrations of selected esters prior and post MLF performed in Aligoté wine with three *O. oeni* recombinant strains.

Ester ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	No inoculation	Oosyn	OoestA2	OoestA7	Reported characteristics ¹	Reported aroma threshold ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ²
Ethyl acetate	50,164 $\pm$ 5616	43,749 $\pm$ 8725	43,749 $\pm$ 2580	45,769 $\pm$ 4128	Fruity, Solvent (at > 100 mg.ml ⁻¹)	7,500 ^w
Isobutyl acetate	52 $\pm$ 7	33 $\pm$ 13	16 $\pm$ 4	32 $\pm$ 6	Fruity, banana	1,600 ^w
Ethyl butanoate	56 $\pm$ 7	46 $\pm$ 9	36 $\pm$ 3	47 $\pm$ 4	Floral, fruity, strawberry	20 ^s
Isoamyl acetate	4,800 $\pm$ 623	3,307 $\pm$ 666	1,896 $\pm$ 277	3,895 $\pm$ 423	Fruity, banana, pear	160 ^w
Ethyl hexanoate	836 $\pm$ 119	899 $\pm$ 11	689 $\pm$ 77	913 $\pm$ 132	Green apple, anise	80-850 ^w
Hexyl acetate	197 $\pm$ 24	145 $\pm$ 3	103 $\pm$ 10	178 $\pm$ 24	Sweet perfume, pear, banana	670-2,400 ^w
Ethyl lactate	14,410 $\pm$ 830	33,682 $\pm$ 5804	34,240 $\pm$ 2404	27,695 $\pm$ 4762	Milk, soapy, buttery	150,000 ^w
Ethyl octanoate	1,731 $\pm$ 130	2,611 $\pm$ 135	2,410 $\pm$ 371	3,329 $\pm$ 649	Ripe fruit, sweet soap, red berry	580 ^w

¹: Aroma characteristics as reported previously in (Sumby, et al. 2010; Swiegers et al. 2005)

²: Aroma threshold as reported previously in (Sumby, Grbin, and Jiranek 2010). Values determined in (s), synthetic wine [11% (v/v) ethanol, 7 g.l⁻¹ glycerol, 5 g.l⁻¹ tartaric acid, pH3.4] and in (w), wine.

Values are the means of triplicate determinations $\pm$ standard deviation, of a single wine analyzed by SPME-GCMS.

Discussion

In this study, we have investigated the impact of two expressed *O. oeni* esterases on the aromatic profiles of wine by using genetically engineered strains to conduct MLF. For the first time, genes with enological interest, *estA2* and *estA7*, were cloned and expressed in *O. oeni*. Recombinant *O. oeni* strains were inoculated in Aligoté wine to perform MLF and the concentrations of esters potentially targeted by these two esterases were measured post MLF step. Presence of vectors in recombinant strains was assessed before inoculation and selection pressure by adding relevant antibiotics was maintained during winemaking. Previous studies have already raised the hypothesis that exploitation of esterases as purified enzyme preparations or as microbial cultures with intrinsic esterase activities can be used to modulate the ester composition of wine (Matthews et al., 2007, 2006; Sumby et al., 2013, 2012a). This research focused on EstA2 and EstA7 in *O. oeni* ATCC BAA-1163 identified by sequence homology using the published sequences of esterases from *O. oeni* Ooeni28 strain. As already noticed by Sumby et al. (2012b), the EstA7 amino-acid sequence from *O. oeni* ATCC BAA-163 is identical to the sequence from *O. oeni* Ooeni28, and to all published *estA7* sequences of *O. oeni* strains. No signal sequences were found

in EstA2 and EstA7 amino-acid sequences, suggesting that these enzymes have a cytoplasmic location (Nakai and Horton, 1999). Given that *O. oeni* is not easily genetically manipulated, our strain choice was principally dictated by technical constraints because of the poor transformability of *O. oeni* (Assad-García et al., 2008; Dicks, 1994). Indeed, the best electrotransformation efficiency is obtained with the *O. oeni* ATCC BAA-1163 (5.8×10^3 per μg of DNA)(Assad-García et al., 2008).

To overcome purification difficulties and to avoid *in vitro* investigation, both esterase genes were cloned and expressed in *E. coli* and then in *O. oeni*. In *E. coli*, maximum esterase activity was observed in EcestA7 strain with a 5.74-fold increase in the relative activity, followed closely by EcestA2 with a 4.93-fold increase. This step of esterase activity assay was essential, first to validate the cloning system, and second to validate the functionality of both esterases encoded by esterase genes. Subsequently, plasmids harboring *estA2* or *estA7* genes were transferred into *O. oeni*. Esterase assays performed for *O. oeni* recombinant strains highlighted a 12.83-fold increase in relative esterase activity for OoestA7 and a 5.80-fold increase for OoestA2. These findings validate the utilization of pSIPSYN as cloning and expression system in *O. oeni*. For the first time in *O. oeni*, we have successfully expressed genes encoding functional proteins, EstA2 and EstA7, showing a quantifiable enzymatic activity. Moreover, the comparison of the ester profiles from genetically engineered strains demonstrated the involvement of these esterases in the synthesis and ester hydrolysis in wine conditions during MLF. Although enzymatic activities of EstA2 and EstA7 have not been assessed in wine, the significant differences observed in ester compositions between the tested strains probably reflect the actual *in vivo* esterase activity during winemaking. Although it has been shown *in vitro* that *O. oeni* esterases exhibit enzymatic activity in wine-relevant conditions (pH3.5 and presence of ethanol) (Sumby et al., 2012a, 2009), our study is the first reporting an existing esterase activity *in vivo* in enological conditions in Aligoté wine.

Thus, we have based our study on eight main esters responsible for fruity flavors in wine (ethyl acetate, isobutyl acetate, ethyl butanoate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl lactate, and ethyl octanoate) released during MLF (Vianna and Ebeler, 2001). Ester profiles of the three *O. oeni* recombinant strains were established in the Aligoté wine by the SPME-GC-MS method (Vianna and Ebeler, 2001). In our experimental conditions combining the *O. oeni* ATCC BAA-1163 strain with native plasmids, the main changes in ester composition were the

increase of ethyl lactate (milk aroma) and ethyl octanoate (ripe fruit aroma), and the decrease of isoamyl acetate (banana and pear aromas) and isobutyl acetate (banana aroma). These results suggested a reduction of the banana aroma with a parallel intensification of the ripe fruit note and were considered as a model profile for the laboratory strain ATCC BAA-1163 on Aligoté wine by which to compare the two other recombinant strains overexpressing esterase genes.

As predicted, ethyl acetate was quantitatively, with ethyl lactate, the predominant ester in all treatments (de Revel et al., 1999; Maicas et al., 1999). No difference between any conditions was detected, suggesting that EstA2 and EstA7 have no detectable hydrolytic or synthetic activity toward this ester. These observations are consistent with the study by (Sumby et al., 2013) who reported that EstA2 has no hydrolytic activity and very little synthetic activity toward ethyl acetate. Likewise, ethyl lactate is produced at the highest concentration during the MLF (Maicas et al., 1999) and increased significantly after MLF performed by Oosyn, OoestA2, and OoestA7 strains relative to uninoculated wine without significant difference between the three inoculation conditions. This suggests that EstA2 and EstA7 also have no detectable hydrolytic or synthetic activity toward ethyl lactate. Given that its formation is correlated with the degree of degradation of malic acid, and so with the release of lactic acid, during MLF, these results are not surprising (de Revel et al., 1999; Maicas et al., 1999).

We have observed that EstA2 mainly caused significant decreases in the concentrations of isoamyl acetate (banana and pear aromas), isobutyl acetate (banana aroma). So, EstA2 appears to have a preference of hydrolytic activity toward esters of the family of fruity flavors, more precisely banana aroma, with a greater preference for C4–C6 fatty acid chains. Our findings are distinct from those reported by Sumby et al. (2013) for the purified EstA2, which displayed an increase in ester hydrolytic activity for C4–C8 fatty acid chains, with the highest relative activity for C8 (ethyl octanoate). EstA2 had a hydrolytic activity toward hexyl acetate, which is associated with the pear and banana aromatic descriptors sought in wine, according to the specific wine. While we have shown that EstA2 had hydrolytic activity toward isoamyl acetate and isobutyl acetate by reducing their concentration by half, the concentration of isoamyl acetate still remained above the reported aroma threshold ($30\text{--}160\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) and isobutyl acetate was still below the aroma threshold ($1600\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$). Nevertheless, even if most esters are present in wine at concentrations around or below the reported aroma threshold, they are extremely important contributors to the flavor profile of wine by having a synergistic effect to collectively impact on

wine aroma (Bartowsky, 2005; Bartowsky and Borneman, 2011; Ferreira et al., 2000; Gómez-Míguez et al., 2007; Swiegers et al., 2005). For this reason, minor concentration changes might have a dramatic effect on wine flavor (Ferreira et al., 2000; Gómez-Míguez et al., 2007; Sumby et al., 2009). The reduction of both isoamyl acetate and isobutyl acetate might be a desirable effect in a typical wine bouquet, because the banana flavor is powerful and can overpower other more subtle flavors.

Despite a percentage of sequence homology near to 59.9% with EstA2, little is known about EstA7 from *O. oeni* because it is unstable and difficult to purify *in vitro* reported by (Sumby et al., 2012b). (Sumby et al., 2012b) explored the expression of *estA7* gene in the presence of natural substrates and suggested that EstA7 could play a more important role in ester synthesis rather than in hydrolysis. Our findings finally highlight that EstA7 has synthetic activity toward hexyl acetate by causing a significant 22.7% increase in this ester concentration (banana and pear aromas) in enological conditions. The increase of hexyl acetate might have a desirable effect on wine by reducing the corresponding ester precursors, acetic acid and hexanol, which are responsible for acetic spoilage and herbaceous aromas, respectively (Swiegers et al., 2005). Thus, a high level of *estA7* expression could be an advantage to increase fruity aromas, namely pear and banana aromas, by reducing hexyl acetate precursors (hexanol and hexanal), which are responsible for herbaceous notes. The screening of enological LAB strains according to their ability to express *estA7* could be used as a method to alter the ester profile of wine. This study provides first evidence elucidating the changes in ester concentration following MLF observed in many studies (Delaquis et al., 2000; Maicas et al., 1999; Matthews et al., 2004; Pozo-Bayón et al., 2005; Ugliano and Moio, 2005). Our findings show for the first time that esterases in *O. oeni* are capable of hydrolyzing or synthesizing esters in wine during MLF. Until now, the best evidence that wine-associated LAB are able to exhibit esterase activity has been from studies that have investigated wine ester profiles during MLF by establishing changes in the concentration of individual esters (Delaquis et al., 2000; Maicas et al., 1999; Pozo-Bayón et al., 2005; Ugliano and Moio, 2005; Vianna and Ebeler, 2001) or studies that have characterized *in vitro*-purified esterases (Sumby et al., 2013, 2012a, 2009). In contrast, our *in vivo* study shows that EstA2 and EstA7 have no influence on ethyl butanoate, ethyl acetate, or ethyl lactate concentrations, meaning that these esterases have no impact on the synthesis or hydrolysis of these esters in Aligoté wine.

Accordingly, our work is the first step to provide enological selection criteria based on the impact of *estA2* and *estA7* on ester profile during MLF and indicates that the expression level of *estA2* and *estA7* genes could be used as a direct application to screen future commercial MLFs. This would enable winemakers to use *O. oeni* fermentations according to the benefits of characterized *O. oeni* enzymes. The role of *O. oeni* esterases on ester profile is far from being complete. Indeed, Versari et al. (1999) used the term “complexity” to describe the contribution of microorganisms during wine aging and there are opposing results on the effect of MLF on wine flavor.

Now that the expression of esterases in *O. oeni* is accomplished in a hostile bacterium that is not easy to manipulate genetically, the investigation of the other esterase genes in *O. oeni*, EstC and EstB, which have been characterized *in vitro*, could be considered (Sumby et al., 2012a, 2012b). Beyond the enological interest, this study confirms the importance of molecular tools developed in the laboratory for studying the functionality of wine-related genes in *O. oeni* in wine conditions. That enological LAB, such as *O. oeni*, can be genetically manipulated is of biotechnological interest, although at present this approach raises societal dilemmas. Moreover, our study implements a self-cloning strategy using a food-grade expression system that could be used instead of adding bacterial enzymes, a technique that consumer preferences preclude in the food industry at present (Maischberger et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Peterbauer et al., 2011; Sørvig et al., 2005).

Acknowledgement

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur and the Institut National supérieur des sciences agronomiques, de l’alimentation et de l’environnement (AgroSup Dijon).

REFERENCES

- Arpigny JL, Jaeger K. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177–183.
- Assad-García J, Bonnin-Jusserand M, Garmyn D, Guzzo J, Alexandre H, Grandvalet C (2008) An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Lett Appl Microbiol* 47:333–338.
- Aznar M, Arroyo T (2007) Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap–gas chromatography–mass spectrometry: Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. *J Chromatogr A* 1165:151–157.
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* 155:1758–1775. doi: 10.1099/mic.0.027839-0
- Bartowsky EJ (2005) *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust J Grape Wine Res* 11:174–187. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x
- Bartowsky EJ, Borneman AR (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:441–447.
- Capozzi, V., Russo, P., Lamontanara, A., Orrù, L., Cattivelli, L., Spano, G., 2014. Genome Sequences of Five *Oenococcus oeni* Strains Isolated from Nero Di Troia Wine from the Same Terroir in Apulia, Southern Italy. *Genome Announc.* 2. doi:10.1128/genomeA.01077-14
- Cavin JF, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Diviès C (1989) Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 55:751–753.
- Darsonval, M., Msadek, T., Alexandre, H., Grandvalet, C., 2015. The antisense RNA approach: a new application for in vivo stress response investigation in *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02495-15
- Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, Lee TH (1988) Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance. *Am J Enol Vitic* 39:137–142.
- Delaquis P, Cliff M, King M, Girard B, Hall J, Reynolds A (2000) Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *Am J Enol Vitic* 51:42–48.

- de las Rivas, B., Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., Muñoz, R., 2009. Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 57, 490–494.
- de Revel G, Martin N, Pripis-Nicolau L, Lonvaud-Funel A, Bertrand A (1999) Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *J Agric Food Chem* 47:4003–4008.
- Dicks LMT (1994) Transformation of *Leuconostoc oenos* by electroporation. *BiotechnolTech* 8:901–904.
- Ebeler SE (2001) Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. *Food Rev Int* 17:45–64.
- Esteban-Torres M, Mancheño JM, las Rivas B de, Muñoz R (2014) Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *J Dairy Sci* 97:6737–6744.
- Fenster KM, Rankin SA, Steele JL (2003b) Accumulation of Short n-Chain Ethyl Esters by Esterases of Lactic Acid Bacteria Under Conditions Simulating Ripening Parmesan Cheese. *J Dairy Sci* 86:2818–2825.
- Fernández L, Beerthuyzen MM, Brown J, Siezen RJ, Coolbear T, Holland R, Kuipers OP (2000) Cloning, Characterization, Controlled Overexpression, and Inactivation of the Major Tributyrin Esterase Gene of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 66:1360–1368.
- Ferreira V, López R, Cacho JF (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J Sci Food Agric* 80:1659–1667.
- Fraunholz M, Bernhardt J, Schuldes J, Daniel R, Hecker M, Sinha B (2013) Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* 6850, a Highly Cytotoxic and Clinically Virulent Methicillin-Sensitive Strain with Distant Relatedness to Prototype Strains. *Genome Announc* 1:e00775–13. doi: 10.1128/genomeA.00775-13.
- Gámbaro A, Boido E, Zlotajblko A, Medina K, Lloret A, Dellacassa E, Carrau F (2001) Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust J Grape Wine Res* 7:27–32.
- Gómez-Míguez MJ, Cacho JF, Ferreira V, Vicario IM, Heredia FJ (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem* 100:1464–1473.
- Lilly M, Bauer FF, Lambrechts MG, Swiegers JH, Cozzolino D, Pretorius IS (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23:641–659.
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317–331.

- Maicas S, Gil J-V, Pardo I, Ferrer S (1999) Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res Int* 32:491–496.
- Maischberger T, Mierau I, Peterbauer CK, Hugenholtz J, Haltrich D (2010) High-Level Expression of *Lactobacillus* β -Galactosidases in *Lactococcus lactis* Using the Food- Grade, Nisin-Controlled Expression System NICE. *J Agric Food Chem* 58:2279–2287.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O’Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15611–15616. doi:10.1073/pnas.0607117103.
- Matthews A, Grbin PR, Jiranek V (2007) Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:329–337.
- Matthews A, Grbin PR, Jiranek V (2006) A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust J Grape Wine Res* 12:235–244.
- Matthews A, Grimaldi A, Walker M, Bartowsky E, Grbin P, Jiranek V (2004) Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Appl Environ Microbiol* 70:5715–5731.
- Mesas J m., Rodríguez M c., Alegre M t. (2012) Basic characterization and partial purification of β -glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81. *Lett Appl Microbiol* 55:247–255.
- Michlmayr H, Kneifel W (2013) β -glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol Lett* 352:1–10.
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24:34–35.
- Nguyen T-T, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen T-H, Eijsink VGH, Haltrich D, Peterbauer CK (2011) A Food-Grade System for Inducible Gene Expression in *Lactobacillus plantarum* Using an Alanine Racemase-Encoding Selection Marker. *J Agric Food Chem* 59:5617–5624.
- Olguín N, Bordons A, Reguant C (2009) Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* 26:197–203. doi: 10.1016/j.fm.2008.09.004

- Olguín N, Bordons A, Reguant C (2010) Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *Int J Food Microbiol* 144:88–95.
- Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D (2011) Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol J* 6:1147–1161.
- Pozo-Bayón MA, G-Alegría E, Polo MC, Tenorio C, Martín-Álvarez PJ, Calvo de la Banda MT, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV (2005) Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. *J Agric Food Chem* 53:8729–8735.
- Saerens SMG, Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Voet ARD, Van Dijck P, Delvaux FR, Thevelein JM (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem* 281:4446–4456.
- Siebert TE, Smyth HE, Capone DL, Neuwöhner C, Pardon KH, Skouroumounis GK, Herderich MJ, Sefton MA, Pollnitz AP (2005) Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 381:937–947.
- Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, van Hijum SAFT (2012) Complete Resequencing and Reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Genome. *J Bacteriol* 194:195–196. doi: 10.1128/JB.06275-11
- Sørvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH, Axelsson L (2005) High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology* 151:2439–2449.
- Sumby K m., Grbin P r., Jiranek V (2012a) Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J Appl Microbiol* 114:413–422.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem* 121:1–16.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2012b) Validation of the use of multiple internal control genes, and the application of real-time quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni* - Springer. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1039–1047.
- Sumby KM, Jiranek V, Grbin PR (2013) Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food Chem* 141:1673–1680.
- Sumby KM, Matthews AH, Grbin PR, Jiranek V (2009) Cloning and Characterization of an Intracellular Esterase from the Wine-Associated Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 75:6729–6735.

- Swiegers J h., Bartowsky E j., Henschke P a., Pretorius I s. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11:139–173.
- Taketo A (1988) DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta* 949:318–324.
- Ugliano M, Moio L (2005) Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem* 53:10134–10139.
- Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M (1999) *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:447–455.
- Vianna E, Ebeler SE (2001) Monitoring Ester Formation in Grape Juice Fermentations Using Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 49:589–595.

Discussion-Perspectives

I. Etude mécanistique de la réponse au stress de *O. oeni*

Tout au long de ce manuscrit, nous avons détaillé les propriétés et singularités de la bactérie *O. oeni* en termes d'adaptation de réponse aux modifications de son environnement. Comme tout microorganisme, *O. oeni* doit en permanence adapter sa physiologie aux fluctuations physico-chimiques de son environnement. Dans ce domaine, nous avons pu voir que *O. oeni* fait preuve d'originalité et que la caractérisation des mécanismes mis en jeu lors de son adaptation à son environnement est vite limitée par des contraintes d'ordre technique qui rendent toutes tentatives d'étude fastidieuses.

I.1. Quels mécanismes contrôlent l'activité du répresseur transcriptionnel CtsR chez *O. oeni* ?

L'un des objectifs principaux de ces travaux de thèse était d'étudier le(s) mécanisme(s) de régulation de l'activité de CtsR et d'identifier son ou ses partenaire(s) impliqué(s) dans la réponse aux stress environnementaux. Afin d'appréhender les mécanismes de régulation de l'activité de CtsR, nous avons utilisé la bactérie *B. subtilis* comme plateforme d'étude. Notre stratégie reposait sur l'association d'un vecteur intégratif permettant une expression de *ctsR* inductible par le xylose avec un système rapporteur utilisant le gène *bgaB* en fusion transcriptionnelle avec la région promotrice du gène *hsp18* de *O. oeni*. L'aptitude de CtsR à réprimer l'expression du gène *hsp18* a ainsi été quantifiée par dosage enzymatique. Dans cette étude, nous avons montré que CtsR agit comme une protéine thermosensible dont l'activité est finement régulée par la température. Par le biais de tests de thermoinduction sur milieu gélosé, nous avons mesuré le taux de répression par CtsR et montré que CtsR se fixe sur son site opérateur préférentiellement à des températures inférieures à 33°C. Comme précédemment mis en évidence chez *B. subtilis*, *L. lactis* et *G. stearothermophilus*, le répresseur CtsR de *O. oeni* est donc un capteur intrinsèque de température inactivé dès 33°C (Elsholz et al. 2010). Si grâce à ces travaux, il est maintenant clair que le phénomène d'association-dissociation du régulateur CtsR avec son site opérateur est dépendant de la température chez *O. oeni*, la région responsable de ce caractère thermosensible n'est pas encore identifiée.

Chez *B. subtilis*, Derré et al. utilisent une technique de mutagenèse aléatoire par traitement préalable à l'hydroxylamine du vecteur intégratif portant le gène *ctsR* pour étudier la thermosensibilité du régulateur (Derré et al. 2000). Toutes les mutations donnant lieu à une

modification de l'activité de CtsR (perte de l'activité de répression à basse température ou maintien de la répression à haute température) concernent des résidus hautement conservés au niveau du domaine HTH, de la région riche en glycine ou de l'extrémité amino-terminale de la séquence peptidique de CtsR (Derré et al. 2000). Les auteurs identifient deux points de mutations empêchant l'inactivation à haute température de CtsR, l'une dans l'extrémité amino-terminale (V16M) et l'autre au niveau de la région centrale riche en glycine (G65S) de CtsR (Derré et al. 2000). Cependant les travaux de Elsholz portant sur la substitution du gène *cstR* de l'opéron *clpC* par une copie portant les mutations V16M et G16S n'ont pas montré de modification de l'activité de CtsR (Elsholz et al. 2010). Ces mêmes travaux montrent que la substitution du résidu 64 (G64P), localisé au sommet du motif tige-boucle formé par le domaine riche en glycine, augmente la thermostabilité de CtsR et empêche l'inactivation du répresseur à haute température chez *B. subtilis*, *L. lactis* et *G. stearothermophilus* (Fuhrmann et al. 2009; Elsholz et al. 2010). De même, la délétion d'un acide aminé dans la région conservée riche en glycine de CtsR confère à une souche piézotolérante de *L. monocytogenes* une résistance à des traitements thermique, acide et oxydatif (and Bennik 2002; Karatzas et al. 2003).

La conservation du résidu Glycine n° 64 dans la séquence peptidique de CtsR peut expliquer le caractère thermosensible du régulateur mais en aucun cas les différences de températures seuils variant en fonction de la bactérie. En effet, bien que le domaine riche en glycine semble être responsable de la thermosensibilité de CtsR, il ne semble pas être le déterminant de la température seuil espèce-dépendante du régulateur. En raison de la parfaite conservation des motifs dans la séquence peptidique de CtsR à travers le phylum des firmicutes, il est difficile d'expliquer ce phénomène de la sensibilité à la température espèce-dépendante (Figure 22). L'implication du domaine de dimérisation dans ce phénomène semble, elle aussi, peu probable, étant donnée la haute conservation du domaine chez les firmicutes. De plus, Elsholz et al. indiquent que le décrochement de CtsR de son site opérateur n'est pas accompagné d'une dissociation du dimère. En revanche, les auteurs considèrent que le bon positionnement du régulateur sur son site opérateur serait affecté par la hausse de température (Elsholz et al. 2010). L'alignement des séquences peptidiques de CtsR de différents représentants du phylum des firmicutes tend à classer les espèces bactériennes selon leur ordre ou selon leur famille mais pas en fonction de leur température optimale de croissance (Figure 22). Contrairement à l'extrémité amino-terminale hautement conservée, l'extrémité carboxy-terminale est une région faiblement

conservée qui présente une importante variabilité (Figure 22) (Derré et al. 2000). Le rôle de cette région reste inconnu, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la stabilité de la protéine *in vivo*. En effet suite à un traitement de la protéine CtsR à la trypsine l'extrémité carboxy-terminale se maintient sous forme d'un fragment compact de 9 kDa résistant aux protéases, tandis que la délétion de cette région (aa 53, 72, 76 ou 124 à aa 154/154) entraîne une dégradation très rapide de CtsR *in vivo* (Derré et al. 2000).

Chez *O. oeni*, l'identification des résidus amino-acides impliqués dans la fonction de thermomètre moléculaire de CtsR pourrait être abordée par la mise en place d'une stratégie similaire à celle utilisée chez *B. subtilis* de mutagenèse aléatoire par un traitement à l'hydroxylamine par Derré et al. (2000) ou par déstabilisation du ratio purine:pyrimidine dans le mélange réactionnel de la PCR (Derré et al. 1999b). Cependant, il y a fort à parier que nous identifierons les mêmes résidus d'acides aminés essentiels à la fonction de CtsR.

Afin de poursuivre l'étude par l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de CtsR de *O. oeni*, nous pourrions donc envisager de construire une souche de *B. subtilis* pour laquelle les gènes *ctsR-mscA-mscB* de l'opéron *ctsR* sont remplacés par le seul gène *ctsR* de *O. oeni* (Figure 34 (1)). Le phénotype de cette souche, analysé via la fusion transcriptionnelle *phsp18'-bgaB*, pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle des gènes homologues à *mcsA* et *mcsB* ne sont pas impliqués dans la régulation de CtsR chez *O. oeni*. En poursuivant cette démarche jusqu'à remplacer l'ensemble de l'opéron *ctsR* de *B. subtilis* (*ctsR-mscA-mscB-clpC*) par l'opéron *ctsR-clpL2* (Figure 34 (2)) ou *ctsR-clpL1* (Figure 34 (3)) de *O. oeni*, nous pourrions ainsi valider le rôle des *clpL* dans la régulation de CtsR.

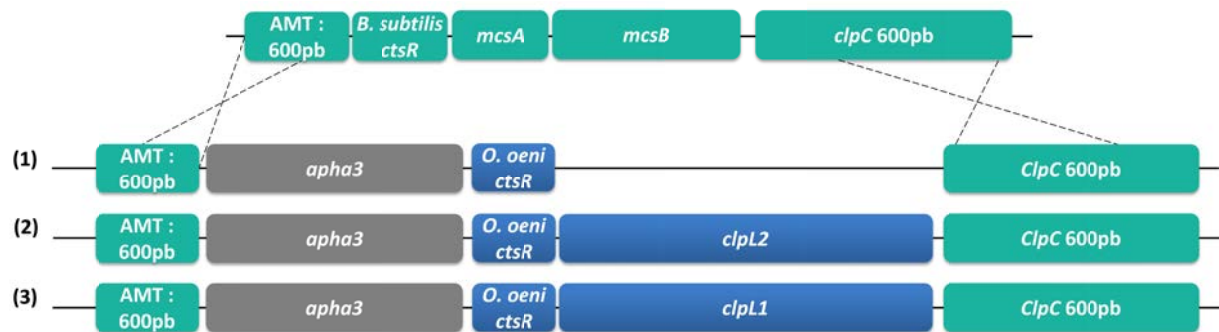


Figure 34 : Stratégie de double recombinaison homologue envisagée pour remplacer l'opéron CtsR de *B. subtilis* par le gène *ctsR* de *O. oeni* (1), par l'opéron *ctsR-clpL2* (2) ou l'opéron *ctsR-clpL1* (3). Construction par PCR d'un opéron composé des 600pb en amont de l'opéron, du gène *apha3* (résistance à la kanamycine), du gène *ctsR* de *O. oeni* et des 600 premières bases du gène *clpC* de *B. subtilis*.

L'identification des partenaires de CtsR est maintenant incontournable et passe par une étude approfondie des interactions protéine-protéine de CtsR avec ses éventuels partenaires. La construction de mutants chez *O. oeni* relevant davantage d'une utopie que d'un futur proche, nous avons récemment entrepris d'étudier les interactions protéine-protéine entre CtsR et des protéines candidates par un système d'expression hétérologue basée sur une technique de double hybride bactérien. L'absence dans le génome de *O. oeni*, des principaux acteurs de la régulation de l'activité de CtsR décrits chez *B. subtilis* et *L. lactis* (*clpE*, *mcsA* et *mcsB*) nous amène à nous interroger sur le mode de régulation mis en œuvre par la bactérie pour réguler l'activité de son répresseur. Si comme décrits chez *B. subtilis* et *L. lactis*, le mode d'action fait intervenir un motif en doigt de zinc (*McsA* et *ClpE*), le mécanisme chez *O. oeni* pourrait faire intervenir les protéines *ClpX* (Derré et al. 1999b; Varmanen et al. 2003). En outre, l'implication du domaine D2-small de *ClpL* chez *S. mutans* (Tao and Biswas 2013a) Tao 2013) et le rôle de cette *Clp*-ATPase dans la prévention de l'aggrégation de CtsR nous laisse supposer l'implication d'un ou des deux gènes *clpL* de *O. oeni* dans le mécanisme de régulation de l'activité de CtsR. Chez *L. lactis*, l'interruption du gène *clpC* n'a aucun effet sur l'activité de CtsR ce qui laisse supposer que *ClpC* n'est pas impliquée dans la régulation de l'activité de CtsR chez les bactéries lactiques (Varmanen et al. 2003) tandis que chez *B. subtilis*, l'inactivation de *clpC* provoque une dérépression partielle des gènes du régulon *ctsR* (Derré et al. 2000). Qu'en est-il chez *O. oeni* ?

Le double hybride bactérien permet la détection d'interactions physiques de deux protéines par le biais de la reconstitution d'une voie de transduction du signal dont le phénotype est facilement observable sur milieu gélosé approprié ou facilement quantifiable par dosage enzymatique colorimétrique (Karimova et al. 1998; Karimova et al. 2000; Karimova et al. 2005; Falord et al.

2011; Falord et al. 2012). L'intégralité des fusions traductionnelles permettant l'étude des interactions protéine-protéines entre CtsR, ClpP, ClpC, ClpX, ClpL1 et ClpL2, vont nous permettre d'appréhender les interactions entre CtsR et les différentes protéines pouvant potentiellement intervenir dans la régulation de son activité. De plus, le double hybride bactérien permettra également l'étude des capacités d'hétéro- ou d'homo-oligomérisation des protéines ClpATPases et de dimérisation de CtsR de *O. oeni*. Jusqu'à maintenant, l'identification des partenaires potentiels du régulateur CtsR chez *O. oeni* a été faite par homologie en s'appuyant sur les cas des bactéries dont le mécanisme de régulation de l'activité de CtsR avaient été élucidés. Il semble que *B. subtilis* comme chez *L. lactis*, ce mécanisme implique un motif en doigt de zinc porté respectivement par la protéine McsA ou la protéine ClpE. Nous pouvons nous interroger sur l'essence de ce motif chez *O. oeni*. Nous avons pu voir qu'aucune protéines codées par le régulon CtsR ne portaient ce motif. De même la protéine Hsp33, dont le gène est potentiellement régulé par CtsR, ne semble pas présenter ce motif dans sa séquence peptidique (Figure 20). L'existence d'une protéine adaptatrice comme McsA chez *B. subtilis* n'est pas à exclure et pourrait établir le lien manquant entre CtsR et ClpL1 ou ClpL2. Ainsi, l'identification de protéines présentant ce motif particulier par une analyse de la séquence génomique de *O. oeni* paraît une piste encourageante dans l'élucidation des mécanismes de régulation de l'activité de CtsR chez *O. oeni*.

1.2. Le ciblage par ARNas comme alternative à la mutagenèse

Toujours dans l'optique de compréhension des mécanismes d'adaptation de *O. oeni* à son environnement tout en s'affranchissant des obstacles de manipulations génétiques de la bactérie, le ciblage des gènes *clpL1* et *clpL2* par production d'ARNas semble une stratégie prometteuse, qu'il serait possible d'améliorer. En effet, lors de nos tentatives de modulation de l'expression du gène *hsp18*, deux stratégies de ciblage par ARNas ont été élaborées : l'une ciblait la région 5'UTR du gène tandis que l'autre ciblait l'intégralité de sa phase codante. La première stratégie s'est révélée non fonctionnelle. Un phénomène de dégradation rapide concomitante à la synthèse de ces ARNas de petite taille (60 pb) pourrait expliquer ce revers. A l'inverse, nous avons pu constater que les ARNas ayant une taille proche de 500 pb couvrant l'intégralité du messenger étaient fonctionnels et permettaient de moduler l'expression des gènes *ctsR* et *hsp18*. Si la taille de l'ARNas fonctionnel est comparable aux cas décrits dans la littérature chez *L. rhamnosus* (Bouazzaoui and LaPointe 2006) ou *L. lactis* (Oddone et al. 2009), elle ne semble pas être un

critère suffisant pour expliquer la fonctionnalité de la méthode. La structure de la molécule d'ARN produite a également son importance. En effet, l'introduction d'un élément stabilisateur à l'extrémité 5' permettrait d'augmenter la stabilité des ARNs et ainsi d'améliorer leur activité d'inhibitrice de la traduction (Engdahl et al. 2001; Man et al. 2011; López-Aguilar et al. 2015). Dès 2001, Engdahl et al. montrent que l'ajout d'une structure secondaire de type tige-boucle à l'extrémité 5' de l'ARNs augmente sa demi-vie et améliore son taux maximum d'inhibition pour atteindre à 75 % contre 50% en absence de cet élément stabilisateur. Cette technique initialement mise au point chez *E. coli*, a récemment été adaptée à un ARN porté par un plasmide pMV158 contrôlant la traduction du gène *repB* chez *Streptococcus pneumoniae* (López-Aguilar et al. 2015). Nous pouvons avancer que la présence d'un terminateur de structure tige-boucle en 3' de l'ARNs présent dans le vecteur pSIPSYN joue ce rôle de stabilisateur.

Lors de la modulation de l'expression du gène *hsp18* par ARNs, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois *in vivo*, l'implication de la protéine dans la thermotolérance et l'acidotolérance de *O. oeni*. Les expériences d'anisotropie de fluorescence ont également montré l'implication de la sHsp dans le recouvrement de la fluidité membranaire lors d'un stress éthanolique. Nous pouvons alors nous interroger sur l'effet qu'aurait la surexpression par le biais du vecteur pSIPSYN de la sHsp sur les propriétés d'acidotolérance et de thermotolérance de *O. oeni*. La modulation de l'expression du gène *ctsR* par production d'ARNs diminue l'acidotolérance et la thermotolérance de *O. oeni*. Chez *L. plantarum*, l'inactivation de *ctsR* et de *hsp16* affecte la morphologie de l'enveloppe cellulaire, il serait donc intéressant d'observer nos souches recombinantes OoASCtsR et OoAS18 en microscopie à force atomique ou en microscopie électronique à balayage (Fiocco et al. 2010; Capozzi et al. 2011a).

Dans la plupart des bactéries à Gram positif décrites jusqu'ici, l'inactivation de *ctsR* conduit à une augmentation de la résistance à la chaleur et de la tolérance au stress général (Nair et al. 2000; Chastanet et al. 2001; Karatzas and Bennik 2002; Hüfner et al. 2007; Zotta et al. 2009). Nos résultats montrent à l'inverse une sensibilité accrue de la bactérie aux hautes températures et aux faibles pH, également observée chez *L. plantarum* (Fiocco et al. 2010; van Bokhorst-van de Veen et al. 2011; van Bokhorst-van de Veen et al. 2013). Cette différence phénotypique pourrait être liée à une surexpression des sHsps. En effet, contrairement aux autres bactéries à Gram positif décrites, le régulon *ctsR* de *O. oeni* et *L. plantarum* coordonne l'expression des gènes codant les

sHsps : respectivement *hsp18* et *hsp18,5* (Figure 19). La surexpression de ces sHsps pourrait être à l'origine d'une déstabilisation membranaire en conditions de stress.

Dans le cas de *O. oeni*, le chevauchement des gènes *ctsR* et *clpC* (*ctsR-clpC*) nous laisse supposer une interférence de l'ARNas sur l'expression de *clpC*. Les différences phénotypiques observées dans notre étude ne peuvent être dissociées d'un éventuel effet polaire sur l'expression de *clpC*. Chez *B. subtilis*, la mutation du gène *clpC* conduit à une dérégulation partielle de l'expression des gènes CtsR-dépendants suggérant un rôle positif de ClpC sur CtsR comparable à un rôle de chaperon activant CtsR ou favorisant sa fixation sur son site opérateur (Derré et al. 2000; Elsholz et al. 2011a). Dans notre cas, l'interférence de l'ARNas dans l'expression de *clpC* pourrait renforcer la dérégulation en supprimant l'éventuel effet positif de ClpC sur l'activité répressive de CtsR décrite chez *B. subtilis* (Derré et al. 2000). L'étude de l'interaction protéine-protéine entre CtsR et ClpC entreprise par double hybride bactérien pourrait nous apporter une bride de réponse quant à une possible activité chaperon de ClpC sur CtsR.

Outre cette approche utilisant la technologie d'ARNas, nous pourrions envisager l'expression à l'aide du pSIPSYN d'un gène *ctsR* muté afin de former des dimères non fonctionnels du répresseur. Cette technique permettrait de nous affranchir du possible effet polaire de la technique d'ARNas.

1.3. Développement d'un outil génétique pour l'exploration fonctionnelle des gènes de *O. oeni*.

Pour mener à bien ces travaux de thèse, le développement d'un outil génétique d'expression performant et fiable était indispensable. Nos travaux ont abouti à la mise au point du pSIPSYN. Ce vecteur dérive du vecteur pSIP409 destiné à l'élaboration de système « food grade », littéralement « de qualité alimentaire » (Sørvig et al. 2003). Les vecteurs pSIP sont composés de cassettes dont l'échange est facilement réalisable. Cette particularité a été utilisée lors de la construction du pSIPSYN et pourra être exploitée dans l'optique d'une éventuelle amélioration du pSIPSYN. La construction d'un système d'auto-clonage de qualité alimentaire acceptable d'un point de vue législatif est possible lors de l'utilisation de systèmes basés sur l'intégration chromosomique de gènes dans la bactérie hôte, ou du moins, lors du remplacement des marqueurs de sélection par antibiotique par d'autres systèmes de sélection. Différents marqueurs de qualité alimentaire ont été mis au point et sont disponibles pour les bactéries lactiques.

La série des vecteurs pSIP a récemment été modifiée dans ce but par le remplacement de son marqueur de sélection *erm* par le gène *alr* de *L. plantarum*. Le gène *alr* code une alanine racémase qui catalyse l'interconversion de la L-alanine avec la D-alanine, essentielle pour la synthèse du peptidoglycane (Hols et al. 1997). L'utilisation de ce gène comme marqueur de sélection nécessite une auxotrophie pour la D-alanine de la part de la bactérie hôte provoquée par la délétion d'un fragment interne de 30 bp pour *L. lactis* et 100 bp pour *L. plantarum*. Les bactéries transformantes sont sélectionnées par leur capacité à croître sur un milieu contenant de la L-alanine. Il s'agit d'un système de sélection basé sur la complémentation de mutations spécifiques dans le gène chromosomique codant une étape essentielle d'une voie métabolique (sélection par complémentation) ou conférant une propriété ou un phénotype particulier à un organisme (Bron et al. 2002; Peterbauer et al. 2011). Ce système de sélection par complémentation nécessite donc deux étapes : (i) la délétion du gène en question dans le chromosome, (ii) la construction du vecteur d'expression portant une complémentation compatible. Ce système *alr* a été mis en application chez *L. plantarum* pour surexprimer une β -glucosidase et a montré un niveau de sélection comparable à celui utilisant le gène *erm* (Nguyen et al. 2011). Chez *S. thermophilus* et *L. lactis*, un gène codant une sHsp montre également une efficacité de sélection comparable au gène *erm*. La sélection par la résistance à haute température était uniquement valable dans un organisme dépourvu de sHsp (El Demerdash et al. 2003). Le choix de la sHsp utilisée déterminera le système de sélection. Ainsi, la protéine Lo18 de *O. oeni* pourrait également conférer une résistance à l'acidité comme montré chez *E. coli* (Morel et al. 2001). Si la délétion d'un gène n'est pas envisageable chez *O. oeni*, les nombreuses auxotrophies naturelles de la bactérie semble une piste prometteuse pour élaborer de nouveaux marqueurs de sélection utilisables en génie génétique et applicable dans le domaine œnologique, dans la limite de la législation du pays. Outre la sélection par complémentation, il est possible de sélectionner des souches recombinantes par l'apport d'une propriété nouvelle à la bactérie.

Si le pSIPSYN répond à la demande élémentaire de vecteur d'expression génétique chez *O. oeni* comportant des signaux de transcription adaptés, il ne permet pas encore de répondre aux besoins de système d'expression inducible ou de système rapporteur. Le transfert du pSIP409 chez *O. oeni* a constitué un test du gène rapporteur *gusA* de *E. coli* sous contrôle du promoteur P_{SppIP} inducible par ajout d'un peptide phéromone. L'absence d'activité glucuronidase en présence du peptide inducteur laissent deux questions en suspens : (i) l'absence d'activité glucuronidase est-

elle due à la non-fonctionnalité du système d'expression inductible ? ou (ii) est-ce que l'expression d'un gène étranger (*gusA*) constitue l'étape limitante chez *O. oeni* ? En effet, à notre connaissance, seuls des gènes issus du génome de *O. oeni* (*clpL2* tronqué (Assad-García et al. 2008), *estA2*, *estA7* (ces travaux), *hsp18* (données non montrées)) ont pu être exprimés avec succès chez *O. oeni*. Dans tous les cas, il s'agit d'auto-clonage donnant lieu à une mérodipléidie. La bactérie semble réfractaire à tout nouveaux gènes.

Ces observations nous amènent à nous interroger quant aux explications pouvant être apportées face à ses échecs. La difficulté d'expression des gènes étrangers chez *O. oeni* pourrait s'expliquer par un biais de codon c'est-à-dire une préférence particulière de *O. oeni* dans la fréquence d'utilisation de certains codons. Cependant, ce phénomène ne se rencontre pas chez les bactéries lactiques utilisées comme hôte en systèmes hétérologues. Ceci prouve encore la non flexibilité de *O. oeni* et son caractère capricieux. Outre ces problèmes d'expression de gènes, la protéine finalement synthétisée peut rencontrer des problèmes de repliement ou de stabilité liés aux conditions intracytoplasmiques telles que le pH_{int} ou la présence de protéases. A l'inverse, différentes expérimentations menées au laboratoire ont montré que l'expression de gènes de *O. oeni* chez d'autres bactéries est tout aussi fastidieuse. Ainsi l'expression du gène *cfa* de *O. oeni* ne complémente que partiellement les souches mutantes de *E. coli* (Grandvalet et al. 2008) et de *L. lactis* (To et al. 2015). De même, la production des transporteurs du L-malate et du citrate de *O. oeni* chez *L. lactis* lors des travaux de thèse de Maryse Bonnin-Jusserand s'est soldée par un échec (Bonnin-Jusserand 2011). L'absence d'activité glucuronidase suite au remplacement du promoteur inductible P_{SppIP} par le promoteur synthétique (P_{SYN}) ou par le promoteur de *hsp18* (P_{hsp18}) nous a conforté dans l'idée que le gène *gusA* n'est pas un bon candidat pour un système rapporteur chez *O. oeni*. Ce revers nous a amenés à nous tourner vers l'utilisation de gènes dont le système rapporteur n'est pas basé sur la détection d'une activité enzymatique. Nous avons donc cloné le gène *egfp* codant une protéine à fluorescence verte (*enhanced green fluorescent protein*) utilisée chez *L. reuteri* sous le contrôle de trois promoteurs différents : le promoteur inductible (P_{SppIP} dans le pSIP409), le promoteur synthétique (P_{SYN} dans le pSPISYN) et le promoteur de *hsp18* (P_{hsp18} dans pSIP18, (annexe 1)) (Lizier et al. 2010). La détection de fluorescence par cytométrie en flux lorsque le gène *egfp* est sous le contrôle du P_{SYN} et P_{hsp18} est un signe prometteur quant à l'utilisation de système rapporteur en fusion traductionnelle ou transcriptionnelle (Données non montrées). En revanche, l'absence de

fluorescence chez les souches recombinantes de *O. oeni* portant le pSIP409eGFP confirme la nonfonctionnalité de l'induction par le peptide-phéromone.

II. Etude de l'impact des gènes estérases de *O. oeni* sur le profil aromatique du vin après FML.

Le nouvel outil d'expression disponible chez *O. oeni* a été valorisé dans le cadre d'une étude de deux gènes d'estérases, *estA2* et *estA7*, impliqués dans la modulation du profil aromatique du vin lors de la FML. Des études précédentes ont soulevé le potentiel des bactéries lactiques d'intérêt œnologique comme une source nouvelle d'enzymes œnologiques purifiées (estérases et glucosidases) et suggèrent une utilisation comme additifs durant la vinification (Matthews et al. 2004; Sumby et al. 2009; Sumby et al. 2012a). Cependant, la demande du consommateur s'oriente de nos jours davantage vers un produit dit « naturel », produit sans additifs. Ainsi, notre étude s'inscrivait dans cette dynamique en proposant d'élucider le rôle du métabolisme estérolytique de *O. oeni* dans un contexte œnologique. Les deux gènes d'estérases, *estA2* et *estA7*, ont été exprimés à l'aide du pSIPSYN chez *O. oeni*. Les souches recombinantes ont été utilisées pour mener la FML afin d'identifier les cibles préférentielles de ces estérases parmi les esters présents dans le vin et ainsi déterminer leur impact sur le profil aromatique volatil du vin. Nous avons montré que l'estérase EstA2 possède une activité majoritairement hydrolytique sur les acétates d'esters issus d'alcools supérieurs avec une préférence pour les chaînes courtes d'acides gras (C4-C6) : l'acétate d'isoamyle, l'acétate d'isobutyl et l'acétate d'hexyle. L'estérase EstA7 a une activité de synthèse sur l'acétate d'hexyle en augmentant significativement de 22,7% la concentration de cet ester.

Peu de données sont actuellement disponibles sur l'estérase EstA7, les difficultés de purification rapportées par Sumby et al. réduisent les possibilités de caractérisation *in vitro* de l'enzyme (Sumby et al. 2012b). Toutefois, les auteurs évoquent une activité détectable envers le *p*NP-butanoate, un substrat synthétique. L'utilisation du pSIPSYN chez *O. oeni* nous a permis de passer outre ses difficultés d'ordre techniques et d'amorcer la caractérisation de l'estérase EstA7. Dans notre étude, cette enzyme présente de façon exceptionnelle une activité synthétique, jamais mise en évidence chez les autres estérases d'intérêt œnologique. L'analyse transcriptionnelle par RTqPCR réalisées par Sumby et al. a mis en évidence une augmentation du taux de transcrits du gène *estA7* lorsque *O. oeni* est cultivée en présence d'éthanol et d'acide butanoïque, l'un des

précurseurs du butanoate d'éthyle (Sumbly et al. 2012b). En revanche, la présence de butanoate d'éthyle dans le milieu ne semblait pas avoir d'impact sur le taux de transcrits de *estA7*. Ces deux observations, également faites pour l'estérase EstA2, suggèrent qu'en dépit de la réversibilité de leur activité, ces estérases semblent davantage impliquées dans la synthèse que dans l'hydrolyse des esters (Sumbly et al. 2012b). Cette hypothèse en accord avec nos conclusions sur l'estérase EstA7 va, toutefois, à l'encontre de nos observations sur l'estérase EstA2. C'est pourquoi notre projet nécessite d'être approfondi par une étude de l'évolution de la concentration des précurseurs (hexanol, butanol, isobutanol, alcool isoamylique) des esters pendant la FML. L'assemblage du puzzle qui établira les liens entre les précurseurs et les esters présents dans le vin permettra de comprendre comment les estérases de *O. oeni* influent sur la composition du vin. L'étude des signaux de transcription et des mécanismes d'induction de la transcription des gènes d'estérases permettrait de faire le lien entre le génotype et le phénotype d'une souche et pourrait expliquer la variabilité inter-souches concernant la production d'esters. Jusqu'à présent, Sumbly et al. ont montré une induction de la transcription des gènes *estA2* et *estA7* en présence concomitante d'acide butyrique et d'éthanol. Il semble légitime de se demander si les autres précurseurs auraient le même rôle inducteur et pourquoi l'éthanol est requis pour l'induction de la transcription.

L'étude des profils aromatiques de souches œnologiques a essentiellement montré que ceux-ci variaient en fonction du genre et même de la souche utilisée pour la fermentation malolactique du vin étudié. Ainsi, il serait nécessaire de compléter nos travaux par une étude sur un moût issu d'un Chardonnay, connu pour ses hautes teneurs en esters ou encore issu d'un Sauvignon afin de mieux appréhender les modulations dues à la surexpression des deux estérases étudiées ici. De plus, une analyse sensorielle sur l'empreinte olfactive des vins expérimentaux permettrait d'évaluer si les changements observés sont détectables par le consommateur.

Notre projet d'étude de l'impact des estérases de *O. oeni* dans un contexte œnologique doit maintenant être poursuivi et complété par une étude du schéma d'action des deux autres gènes d'estérases de *O. oeni* : *estB* et *estC*. Ces deux estérases sont des estérases intracellulaires identifiées par une analyse *in silico*, respectivement, chez Ooeni8 et Ooeni28, deux souches de *O. oeni* commercialisées par les sociétés Lallemant et CHR Hansen. Si l'action de l'estérase EstB est relativement bien caractérisée par des études *in vitro* montrant une préférence pour les

susstrats synthétiques et naturels à courtes chaînes carbonées (C2-C4) et une activité réversible de synthèse et d'hydrolyse, aucune donnée n'est disponible quant à ses rôle et action en milieu vin lors de la FML (Sumby et al. 2009; Sumby et al. 2012b; Sumby et al. 2013). Concernant l'estérase EstC, seule une préférence de substrat comparable à l'estérase EstB a été identifiée *in vitro* lors d'expériences menées à partir de l'enzyme purifiée (Sumby et al. 2012a). Toutefois, l'impact aromatique de ces deux estérases en conditions œnologiques reste un domaine inexploré.

Outre les estérases, les bactéries lactiques possèdent une gamme complète de voies métaboliques secondaires et d'enzymes (β -glycosidases, lipases, tannases et protéases) à l'origine de la libération de composés volatils à fort potentiel aromatique (Bartowsky 2005; Bartowsky and Borneman 2011). La mise au point du pSIPSYN a considérablement le champ des applications dans le domaine de l'œnologie pour l'étude des gènes impliqués dans la modulation du profil aromatique du vin lors de la FML. Michlmayr et al. ont récemment identifié le gène *bgl* codant une β -glucosidase, unique représentante de la famille dans le génome de *O. oeni* (Michlmayr et al. 2010). Grâce à leur activité β -glucosidase, les bactéries lactiques d'intérêt œnologique sont capables d'influer sur l'empreinte aromatique d'un vin en libérant des composés terpenoïdes à partir de précurseurs glucosides issus de la baie de raisin (Maicas and Mateo 2005; Spano et al. 2005b; Ugliano and Moio 2005). Une grande variabilité en terme d'activité β -glucosidase existe parmi les souches de *O. oeni* (Matthews et al. 2004; Bartowsky and Borneman 2011; Zapparoli et al. 2012). A l'instar des études sur les estérases de *O. oeni*, celles concernant les β -glucosidases sont principalement basées sur l'étude de l'activité β -glucosidasique de souches œnologiques en milieu vin (Pérez-Martín et al. 2011; Cappello et al. 2014a; Cappello et al. 2014b) ou sur la caractérisation *in vitro* de β -glucosidases purifiées (Michlmayr et al. 2010; Mesas et al. 2012). L'expression du gène *bgl* à l'aide du pSIPSYN permettrait l'étude de l'effet de l'activité β -glucosidase de *O. oeni* dans un contexte œnologique et d'identifier son schéma d'action.

Conclusion

Malgré le caractère capricieux et réfractaire à toute entrée d'ADN exogène de *O. oeni*, ce travail de thèse a abouti à l'élaboration d'un vecteur d'expression stable portant des signaux de transcription adaptée à la bactérie. Ce vecteur, le pSIPSYN, a pu être valorisé dans deux approches expérimentales innovantes et originales : (i) la production d'enzymes d'intérêt oenologique pour comprendre l'impact du métabolisme secondaire de *O. oeni* lors de la FML ; (ii) la production d'ARNas pour inhiber l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie à son environnement (Figure). Avec cette technique, nous avons pu, pour la première fois, moduler l'expression d'un gène chez *O. oeni* et approfondir les connaissances sur les mécanismes d'adaptation au milieu vin de la bactérie. Le ciblage par ARNas laisse entrevoir la possibilité d'étudier de la réponse au stress de *O. oeni* de façon approfondie et *in situ* en attendant que la construction de mutants par délétion soit envisageable.

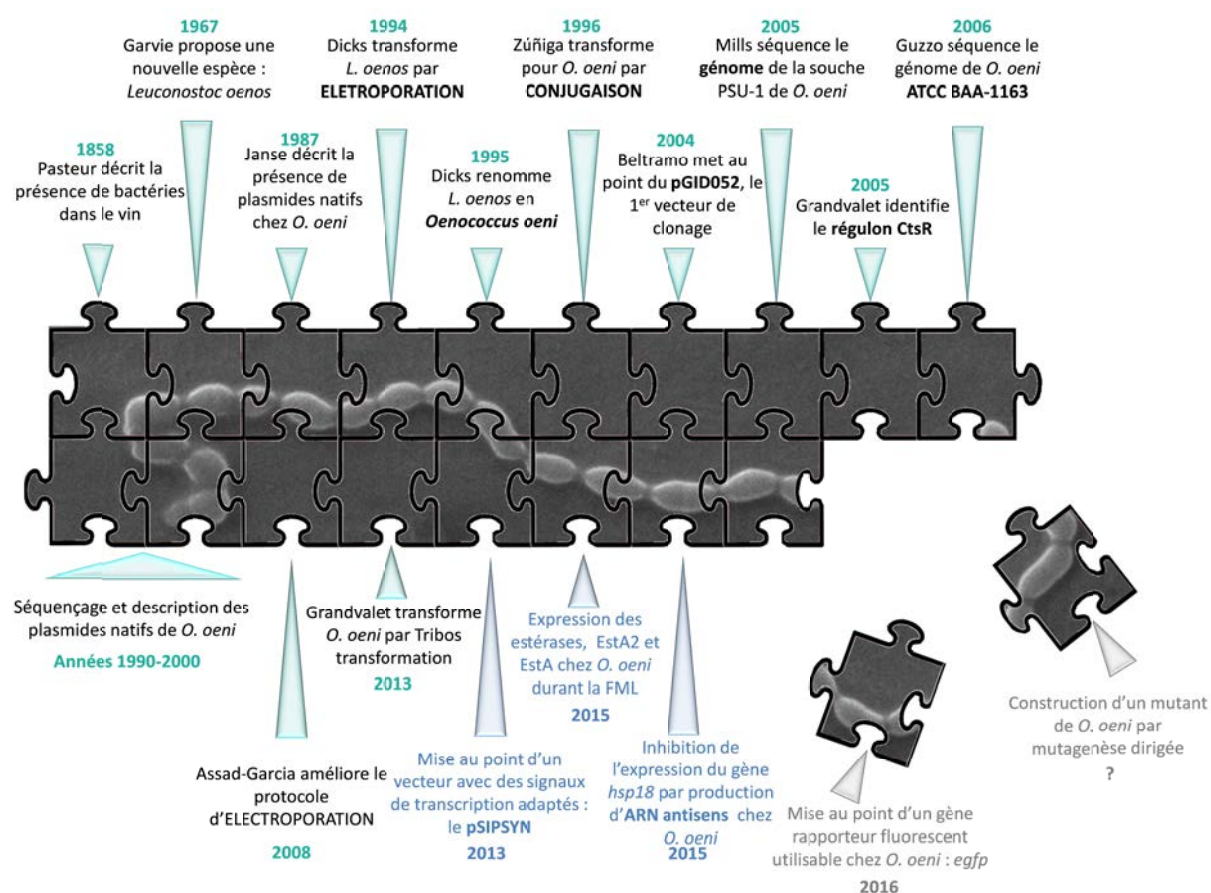


Figure 35 : Perspectives historiques et jalons de l'exploration fonctionnelle des gènes de *O. oeni* : séquençage, transformation, identification de l'ADN chromosomique et outils génétiques. Les étapes en bleues se rapportent aux travaux effectués au cours de cette thèse, en gris les perspectives à venir dans l'exploration fonctionnelle de *O. oeni*.

Bien que *O. oeni* soit un sujet d'étude particulièrement ingrat, la compréhension des mécanismes d'adaptation de cette bactérie à son environnement viti-vinicole est essentielle pour l'optimisation et la production de ferments malolactiques performants, car que serait le vin sans *O. oeni* !

Références bibliographiques

A

- Aguado A, Fernández-Higuero JA, Cabrera Y, Moro F, Muga A (2015) ClpB dynamics is driven by its ATPase cycle and regulated by the DnaK system and substrate proteins. *Biochem J* 466:561–570. doi: 10.1042/BJ20141390
- Ahn S-J, Lemos JAC, Burne RA (2005) Role of HtrA in Growth and Competence of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* 187:3028–3038. doi: 10.1128/JB.187.9.3028-3038.2005
- Alegre MT, Rodríguez MC, Mesas JM (1999) Nucleotide Sequence Analysis of pRS1, a Cryptic Plasmid from *Oenococcus oeni*. *Plasmid* 41:128–134. doi: 10.1006/plas.1998.1382
- Alexandre H, Costello PJ, Remize F, Guzzo J, Guilloux-Benatier M (2004) *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* 93:141–154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.013
- Alexandre H, Grandvalet C, Guilloux-Bénatier M, Remize F, Tourdot-Maréchal R (2008) Les bactéries lactiques en oenologie. Technique et documentation
- Alexopoulos JA, Guarné A, Ortega J (2012) ClpP: A structurally dynamic protease regulated by AAA+ proteins. *J Struct Biol* 179:202–210. doi: 10.1016/j.jsb.2012.05.003
- Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3906–3912. doi: 10.1073/pnas.0409188102
- Arendt EK, Lonvaud A, Hammes WP (1991) Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. *J Gen Microbiol* 137:2135–2139.
- Arevalo-Villena M, Bartowsky EJ, Capone D, Sefton MA (2010) Production of indole by wine-associated microorganisms under oenological conditions. *Food Microbiol* 27:685–690. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.011
- Arpigny JL, Jaeger K. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177–183.
- Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Res Int* 2015:584183. doi: 10.1155/2015/584183
- Assad-García J, Bonnin-Jusserand M, Garmyn D, Guzzo J, Alexandre H, Grandvalet C (2008) An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Lett Appl Microbiol* 47:333–338.

- Augagneur Y, Ritt J-F, Linares DM, Remize F, Tourdot-Maréchal R, Garmyn D, Guzzo J (2007) Dual effect of organic acids as a function of external pH in *Oenococcus oeni*. Arch Microbiol 188:147–157. doi: 10.1007/s00203-007-0230-0
- Axelsson LT, Ahrné SEI, Andersson MC, Ståhl SR (1988) Identification and cloning of a plasmid-encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. Plasmid 20:171–174. doi: 10.1016/0147-619X(88)90023-6
- Azcarate-Peril MA, McAuliffe O, Altermann E, Lick S, Russell WM, Klaenhammer TR (2005) Microarray Analysis of a Two-Component Regulatory System Involved in Acid Resistance and Proteolytic Activity in *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol 71:5794–5804. doi: 10.1128/AEM.71.10.5794-5804.2005
- Aznar M, Arroyo T (2007) Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap–gas chromatography–mass spectrometry: Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. J Chromatogr A 1165:151–157.

B

- Badotti F, Moreira APB, Tonon LAC, Lucena BTL de, Gomes F de CO, Kruger R, Thompson CC, Jr MA de M, Rosa CA, Thompson FL (2014) *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. Antonie Van Leeuwenhoek 106:1259–1267. doi: 10.1007/s10482-014-0296-z
- Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. Int J Food Microbiol 153:243–259. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C, Danchin A (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. Microbiology 155:1758–1775. doi: 10.1099/mic.0.027839-0
- Barnett ME, Zolkiewska A, Zolkiewski M (2000) Structure and Activity of ClpB from *Escherichia coli* role of the amino- and carboxyl-terminal domains. J Biol Chem 275:37565–37571. doi: 10.1074/jbc.M005211200
- Bartowsky EJ (2005) *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. Aust J Grape Wine Res 11:174–187. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x
- Bartowsky EJ, Borneman AR (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. Appl Microbiol Biotechnol 92:441–447.
- Basha E, O'Neill H, Vierling E (2012) Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. Trends Biochem Sci 37:106–117. doi: 10.1016/j.tibs.2011.11.005

- Beltramo C (2004) La réponse aux stress chez *Oenococcus oeni*, une bactérie de la fermentation malolactique des vins : expression différentielle de gènes et mise en oeuvre d'une technique de transfert génétique. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne
- Beltramo C, Desroche N, Tourdot-Maréchal R, Grandvalet C, Guzzo J (2006) Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Res Microbiol* 157:267–274. doi: 10.1016/j.resmic.2005.07.006
- Beltramo C, Grandvalet C, Pierre F, Guzzo J (2004a) Evidence for Multiple Levels of Regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL Locus Expression in Response to Stress. *J Bacteriol* 186:2200–2205. doi: 10.1128/JB.186.7.2200-2205.2003
- Beltramo C, Oraby M, Bourel G, Garmyn D, Guzzo J (2004b) A new vector, pGID052, for genetic transfer in *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* 236:53–60. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09626.x
- Betteridge A, Grbin P, Jiranek V (2015) Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.008
- Bilhère E, Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2009) Multilocus Sequence Typing of *Oenococcus oeni*: Detection of Two Subpopulations Shaped by Intergenic Recombination. *Appl Environ Microbiol* 75:1291–1300. doi: 10.1128/AEM.02563-08
- Bon E, Delaherche A, Bilhère E, Daruvar AD, Lonvaud-Funel A, Marrec CL (2009) *Oenococcus oeni* Genome Plasticity Is Associated with Fitness. *Appl Environ Microbiol* 75:2079–2090. doi: 10.1128/AEM.02194-08
- Bonnin-Jusserand M (2011) Etude métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne
- Bonnin-Jusserand M, Grandvalet C, David V, Alexandre H (2011) Molecular Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Ornithine Decarboxylase from *Oenococcus oeni*. *J Food Prot* 74:1309–1314. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-466
- Booth IR (2002) Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* 78:19–30.
- Bordas M, Araque I, Alegret JO, El Khoury M, Lucas P, Rozès N, Reguant C, Bordons A (2013) Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int Microbiol* 16:113–123. doi: 10.2436/im.v16i2.72579
- Borneman AR, Bartowsky EJ, McCarthy J, Chambers PJ (2010) Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:681–691. doi: 10.1007/s00253-009-2425-6

- Borneman AR, McCarthy JM, Chambers PJ, Bartowsky EJ (2012) Functional Divergence in the Genus *Oenococcus* as Predicted by Genome Sequencing of the Newly-Described Species, *Oenococcus kitaharae*. PLoS ONE 7:e29626. doi: 10.1371/journal.pone.0029626
- Bouazzaoui K, LaPointe G (2006) Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*. J Microbiol Methods 65:216–225. doi: 10.1016/j.mimet.2005.07.011
- Bourdineaud J-P, Nehmé B, Tesse S, Lonvaud-Funel A (2003) The *ftsH* Gene of the Wine Bacterium *Oenococcus oeni* Is Involved in Protection against Environmental Stress. Appl Environ Microbiol 69:2512–2520. doi: 10.1128/AEM.69.5.2512-2520.2003
- Bourdineaud J-P, Nehmé B, Tesse S, Lonvaud-Funel A (2004) A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. Int J Food Microbiol 92:1–14. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00162-4
- Bridier J, Claisse O, Coton M, Coton E, Lonvaud-Funel A (2010) Evidence of Distinct Populations and Specific Subpopulations within the Species *Oenococcus oeni*. Appl Environ Microbiol 76:7754–7764. doi: 10.1128/AEM.01544-10
- Brito L, Paveia H (1999) Presence and Analysis of Large Plasmids in *Oenococcus oeni*. Plasmid 41:260–267. doi: 10.1006/plas.1999.1397
- Brito L, Vieira G, Santos MA, Paveia H (1996) Nucleotide Sequence Analysis of pOg32, a Cryptic Plasmid from *Leuconostoc oenos*. Plasmid 36:49–54. doi: 10.1006/plas.1996.0031
- Britz T j., Tracey R p. (1990) The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J Appl Bacteriol 68:23–31. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02544.x
- Bron PA, Benchimol MG, Lambert J, Palumbo E, Deghorain M, Delcour J, Vos WM de, Kleerebezem M, Hols P (2002) Use of the *alr* Gene as a Food-Grade Selection Marker in Lactic Acid Bacteria. Appl Environ Microbiol 68:5663–5670. doi: 10.1128/AEM.68.11.5663-5670.2002
- Bruel N, Castanié-Cornet M-P, Cirinesi A-M, Koningstein G, Georgopoulos C, Lührink J, Genevoux P (2012) Hsp33 Controls Elongation Factor-Tu Stability and Allows *Escherichia coli* Growth in the Absence of the Major DnaK and Trigger Factor Chaperones. J Biol Chem 287:44435–44446. doi: 10.1074/jbc.M112.418525
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. Cell 92:351–366. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80928-9

C

- Calloni G, Chen T, Schermann SM, Chang H, Genevoux P, Agostini F, Tartaglia GG, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2012) DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. Cell Rep 1:251–264. doi: 10.1016/j.celrep.2011.12.007

- Campbell-Sills H, Khoury ME, Favier M, Romano A, Biasioli F, Spano G, Sherman DJ, Bouchez O, Coton E, Coton M, Okada S, Tanaka N, Dols-Lafargue M, Lucas PM (2015) Phylogenomic Analysis of *Oenococcus oeni* Reveals Specific Domestication of Strains to Cider and Wines. *Genome Biol Evol* 7:1506–1518. doi: 10.1093/gbe/evv084
- Capozzi V, Arena MP, Crisetti E, Spano G, Fiocco D (2011a) The hsp 16 Gene of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* Is Differently Regulated by Salt, High Temperature and Acidic Stresses, as Revealed by Reverse Transcription Quantitative PCR (qRT-PCR) Analysis. *Int J Mol Sci* 12:5390–5405. doi: 10.3390/ijms12085390
- Capozzi V, Weidmann S, Fiocco D, Rieu A, Hols P, Guzzo J, Spano G (2011b) Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Res Microbiol* 162:419–425. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.010
- Cappello MS, De Domenico S, Logrieco A, Zapparoli G (2014a) Bio-molecular characterisation of indigenous *Oenococcus oeni* strains from Negroamaro wine. *Food Microbiol* 42:142–148. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.004
- Cappello MS, De Domenico S, Logrieco A, Zapparoli G (2014b) Bio-molecular characterisation of indigenous *Oenococcus oeni* strains from Negroamaro wine. *Food Microbiol* 42:142–148. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.004
- Carreté R, Vidal MT, Bordons A, Constantí M (2002) Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* 211:155–159. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11218.x
- Castanié-Cornet M-P, Bruel N, Genevaux P (2014) Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1843:1442–1456. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.007
- Cavin JF, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Diviès C (1989) Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Appl Environ Microbiol* 55:751–753.
- Cecconi D, Milli A, Rinalducci S, Zolla L, Zapparoli G (2009) Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis* 30:2988–2995. doi: 10.1002/elps.200900228
- Chandu D, Nandi D (2004) Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Res Microbiol* 155:710–719. doi: 10.1016/j.resmic.2004.06.003
- Chastanet A, Derre I, Nair S, Msadek T (2004) clpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol* 186:1165–1174.

- Chastanet A, Fert J, Msadek T (2003) Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 47:1061–1073.
- Chastanet A, Msadek T (2003) ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 185:683–687.
- Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* clp genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* 183:7295–7307. doi: 10.1128/JB.183.24.7295-7307.2001
- Chitlaru T, Zaide G, Ehrlich S, Inbar I, Cohen O, Shafferman A (2011) HtrA is a major virulence determinant of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 81:1542–1559. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07790.x
- Chu-Ky S, Tourdot-Maréchal R, Maréchal P-A, Guzzo J (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1717:118–124. doi: 10.1016/j.bbamem.2005.09.015
- Confalonieri F, Duguet M (1995) A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 17:639–650. doi: 10.1002/bies.950170710
- Costantini A, Vaudano E, Del Prete V, Danei M, Garcia-Moruno E (2009) Biogenic Amine Production by Contaminating Bacteria Found in Starter Preparations Used in Winemaking. *J Agric Food Chem* 57:10664–10669. doi: 10.1021/jf9025426
- Coton E, Rollan G, Bertrand A, Lonvaud-Funel A (1998) Histamine-Producing Lactic Acid Bacteria in Wines: Early Detection, Frequency, and Distribution. *Am J Enol Vitic* 49:199–204.
- Coucheney F, Desroche N, Bou M, Tourdot-Maréchal R, Dulau L, Guzzo J (2005) A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol* 105:463–470. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.023
- Cox DJ, Henick-Kling T (1989) Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J Bacteriol* 171:5750–5752.
- Cronan J (2002) Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 5:202–205. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00297-7
- Croxen MA, Ernst PB, Hoffman PS (2007) Antisense RNA Modulation of Alkyl Hydroperoxide Reductase Levels in *Helicobacter pylori* Correlates with Organic Peroxide Toxicity but Not Infectivity. *J Bacteriol* 189:3359–3368.
- Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large

family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* 2:366–382. doi: 10.1002/pro.5560020309

D

Dahl J-U, Gray MJ, Jakob U (2015) Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J Mol Biol* 427:1549–1563. doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.014

Darsonval M, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C (2015) The antisense RNA approach: a new application for in vivo stress response investigation in *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.*

Da Silveira M g., Abee T (2009) Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *J Appl Microbiol* 106:1690–1696. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04136.x

Da Silveira M g., Baumgärtner M, Rombouts FM, Abee T (2004) Effect of Adaptation to Ethanol on Cytoplasmic and Membrane Protein Profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 70:2748–2755. doi: 10.1128/AEM.70.5.2748-2755.2004

Da Silveira M g., Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, Abee T (2003) Membrane Fluidity Adjustments in Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* 69:5826–5832. doi: 10.1128/AEM.69.10.5826-5832.2003

Da Silveira M g., Romão MVS, Loureiro-Dias MC, Rombouts FM, Abee T (2002) Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* 68:6087–6093. doi: 10.1128/AEM.68.12.6087-6093.2002

David S, Simons G, Vos WMD (1989) Plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc paramesenteroides* and its use in molecular cloning. *Appl Environ Microbiol* 55:1483–1489.

Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, Lee TH (1988a) Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance. *Am J Enol Vitic* 39:137–142.

Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, Lee TH (1988b) Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance. *Am J Enol Vitic* 39:137–142.

Davis C, Silveira NF, Fleet GH (1985) Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol* 50:872–876.

Delaherche A, Bon E, Dupé A, Lucas M, Arveiler B, Daruvar AD, Lonvaud-Funel A (2006) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:394–403. doi: 10.1007/s00253-006-0487-2

Delaquis P, Cliff M, King M, Girard B, Hall J, Reynolds A (2000a) Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines

- Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *Am J Enol Vitic* 51:42–48.
- Delaquis P, Cliff M, King M, Girard B, Hall J, Reynolds A (2000b) Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *Am J Enol Vitic* 51:42–48.
- de las Rivas B, Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, Muñoz R (2009a) Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. *J Agric Food Chem* 57:490–494.
- de las Rivas B, Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, Muñoz R (2009b) Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. *J Agric Food Chem* 57:490–494.
- 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*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:601–610.
- de Moreno de LeBlanc A, Del Carmen S, Chatel J-M, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG (2015) Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol Res Pract* 2015:146972. doi: 10.1155/2015/146972
- Denich T., Beaudette L., Lee H, Trevors J. (2003) Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* 52:149–182. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00155-0
- de Revel G, Martin N, Pripis-Nicolau L, Lonvaud-Funel A, Bertrand A (1999) Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *J Agric Food Chem* 47:4003–4008.
- Derré I, Rapoport G, Devine K, Rose M, Msadek T (1999a) ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 32:581–593.
- Derré I, Rapoport G, Msadek T (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol* 38:335–347.
- Derré I, Rapoport G, Msadek T (1999b) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 31:117–131.
- DeSantis ME, Sweeny EA, Snead D, Leung EH, Go MS, Gupta K, Wendler P, Shorter J (2014) Conserved Distal Loop Residues in the Hsp104 and ClpB Middle Domain Contact Nucleotide-binding Domain 2 and Enable Hsp70-dependent Protein Disaggregation. *J Biol Chem* 289:848–867. doi: 10.1074/jbc.M113.520759

- 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*. J Microbiol Methods 60:325–333. doi: 10.1016/j.mimet.2004.10.010
- de Stoppelaar SF, Bootsma HJ, Zomer A, Roelofs JJTH, Hermans PWM, van 't Veer C, van der Poll T (2013) *Streptococcus pneumoniae* Serine Protease HtrA, but Not SFP or PrtA, Is a Major Virulence Factor in Pneumonia. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0080062
- Deuerling E, Mogk A, Richter C, Purucker M, Schumann W (1997) The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. Mol Microbiol 23:921–933. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2721636.x
- Deuerling E, Paeslack B, Schumann W (1995) The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift. J Bacteriol 177:4105–4112.
- Dicks LMT (1994) Transformation of *Leuconostoc oenos* by electroporation. Biotechnol Tech 8:901–904.
- Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD (1995) Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 45:395–397. doi: 10.1099/00207713-45-2-395
- Doria F, Napoli C, Costantini A, Berta G, Saiz J-C, Garcia-Moruno E (2013) Development of a New Method for Detection and Identification of *Oenococcus oeni* Bacteriophages Based on Endolysin Gene Sequence and Randomly Amplified Polymorphic DNA. Appl Environ Microbiol 79:4799–4805. doi: 10.1128/AEM.01307-13
- Doyle SM, Kravats AN, Hoskins JR, Shih Y-H, Stan G, Wickner S (2015) 50 Interaction and collaboration between DnaK and ClpB during protein disaggregation. J Biomol Struct Dyn 33:34–35. doi: 10.1080/07391102.2015.1032599
- Doyle SM, Wickner S (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. Trends Biochem Sci 34:40–48. doi: 10.1016/j.tibs.2008.09.010

E

- Ebeler SE (2001) Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. Food Rev Int 17:45–64.
- Ekaza E, Teyssier J, Ouahrani-Bettache S, Liautard J-P, Köhler S (2001) Characterization of *Brucella* suis *clpB* and *clpAB* Mutants and Participation of the Genes in Stress Responses. J Bacteriol 183:2677–2681. doi: 10.1128/JB.183.8.2677-2681.2001
- Elad N, Farr GW, Clare DK, Orlova EV, Horwich AL, Saibil HR (2007) Topologies of a Substrate Protein Bound to the Chaperonin GroEL. Mol Cell 26:415–426. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.004

- El Demerdash, Heller KJ, Geis A (2003) Application of the shsp Gene, Encoding a Small Heat Shock Protein, as a Food-Grade Selection Marker for Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:4408–4412. doi: 10.1128/AEM.69.8.4408-4412.2003
- El Gharniti F, Dols-Lafargue M, Bon E, Claisse O, Miot-Sertier C, Lonvaud A, Le Marrec C (2012) IS30 elements are mediators of genetic diversity in *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 158:14–22. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.009
- Elsholz AKW, Hempel K, Michalik S, Gronau K, Becher D, Hecker M, Gerth U (2011a) Activity Control of the ClpC Adaptor McsB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193:3887–3893. doi: 10.1128/JB.00079-11
- Elsholz AKW, Hempel K, Pöther D-C, Becher D, Hecker M, Gerth U (2011b) CtsR inactivation during thiol-specific stress in low GC, Gram+ bacteria. *Mol Microbiol* 79:772–785. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07489.x
- Elsholz AKW, Michalik S, Zühlke D, Hecker M, Gerth U (2010) CtsR, the Gram-positive master regulator of protein quality control, feels the heat. *EMBO J* 29:3621–3629. doi: 10.1038/emboj.2010.228
- Endo A, Okada S (2006) *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2345–2348. doi: 10.1099/ij.s.0.64288-0
- Engdahl HM, Hjalt TA, Wagner EG (1997) A two unit antisense RNA cassette test system for silencing of target genes. *Nucleic Acids Res* 25:3218–3227.
- Engdahl HM, Lindell M, Wagner EGH (2001) Introduction of an RNA Stability Element at the 5'-End of an Antisense RNA Cassette Increases the Inhibition of Target RNA Translation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 11:29–40. doi: 10.1089/108729001750072100
- Eom H-J, Moon J-S, Cho SK, Kim JH, Han NS (2012) Construction of theta-type shuttle vector for *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria using pCB42 isolated from kimchi. *Plasmid* 67:35–43. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.11.003
- Eriksson MJ, Clarke AK (1996) The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 178:4839–4846.
- Esteban-Torres M, Mancheño JM, de las Rivas B, Muñoz R (2014) Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *J Dairy Sci* 97:6737–6744.

F

- Falord M, Karimova G, Hiron A, Msadek T (2012) GraXSR Proteins Interact with the VraFG ABC Transporter To Form a Five-Component System Required for Cationic

- Antimicrobial Peptide Sensing and Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1047–1058. doi: 10.1128/AAC.05054-11
- Falord M, Mäder U, Hiron A, Débarbouillé M, Msadek T (2011) Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR Regulon Reveals Novel Links to Virulence, Stress Response and Cell Wall Signal Transduction Pathways. *PLoS ONE* 6:e21323. doi: 10.1371/journal.pone.0021323
- Favier M, Bilhere E, Lonvaud-Funel A, Moine V, Lucas PM (2012) Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0049082
- Fenster KM, Parkin KL, Steels JL (2003a) Intracellular esterase from *Lactobacillus casei* LILA: nucleotide sequencing, purification, and characterization. *J Dairy Sci* 86:1118–1129.
- Fenster KM, Rankin SA, Steele JL (2003b) Accumulation of Short n-Chain Ethyl Esters by Esterases of Lactic Acid Bacteria Under Conditions Simulating Ripening Parmesan Cheese. *J Dairy Sci* 86:2818–2825.
- Fernández L, Beerthuyzen MM, Brown J, Siezen RJ, Coolbear T, Holland R, Kuipers OP (2000) Cloning, Characterization, Controlled Overexpression, and Inactivation of the Major Tributyrin Esterase Gene of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 66:1360–1368.
- Ferreira A b., De Oliveira M. V, Freitas F s., Alfenas-Zerbini P, Da Silva D f., De Queiroz M v., Borges A c., De Moraes C a. (2013) Increased expression of *clp* genes in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposed to acid stress and bile salts. *Benef Microbes* 4:367–374. doi: 10.3920/BM2013.0022
- Ferreira V, López R, Cacho JF (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J Sci Food Agric* 80:1659–1667.
- Fiocco D, Capozzi V, Collins M, Gallone A, Hols P, Guzzo J, Weidmann S, Rieu A, Msadek T, Spano G (2010) Characterization of the CtsR Stress Response Regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 192:896–900. doi: 10.1128/JB.01122-09
- Fiocco D, Collins M, Muscariello L, Hols P, Kleerebezem M, Msadek T, Spano G (2009) The *Lactobacillus plantarum* ftsH Gene Is a Novel Member of the CtsR Stress Response Regulon. *J Bacteriol* 191:1688–1694. doi: 10.1128/JB.01551-08
- Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P (1984) Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Appl Environ Microbiol* 48:1034–1038.
- 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*. *Int J Food Microbiol* 140:136–145. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.007

- Fortier L-C, Tourdot-Maréchal R, Diviès C, Lee BH, Guzzo J (2003) Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. FEMS Microbiol Lett 222:165–169. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00299-4
- Foucaud-Scheunemann C, Poquet I (2003) HtrA is a key factor in the response to specific stress conditions in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett 224:53–59. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00419-1
- Fraunholz M, Bernhardt J, Schuldes J, Daniel R, Hecker M, Sinha B (2013) Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* 6850, a Highly Cytotoxic and Clinically Virulent Methicillin-Sensitive Strain with Distant Relatedness to Prototype Strains. Genome Announc 1:e00775–13. doi: 10.1128/genomeA.00775-13
- Frees D, Chastanet A, Qazi S, Sørensen K, Hill P, Msadek T, Ingmer H (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 54:1445–1462. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04368.x
- Frees D, Gerth U, Ingmer H (2014) Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 304:142–149. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.009
- Frees D, Ingmer H (1999) ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol 31:79–87. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01149.x
- Frees D, Qazi SNA, Hill PJ, Ingmer H (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. Mol Microbiol 48:1565–1578. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03524.x
- Frees D, Savijoki K, Varmanen P, Ingmer H (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. Mol Microbiol 63:1285–1295. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x
- Fremaux C, Aigle M, Lonvaud-Funel A (1993) Sequence Analysis of *Leuconostoc oenos* DNA: Organization of pLo13, a Cryptic Plasmid. Plasmid 30:212–223. doi: 10.1006/plas.1993.1053
- Fuhrmann J, Schmidt A, Spiess S, Lehner A, Turgay K, Mechtler K, Charpentier E, Clausen T (2009) McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. Science 324:1323–1327. doi: 10.1126/science.1170088

G

- Galland D, Tourdot-Maréchal R, Abraham M, Chu KS, Guzzo J (2003) Absence of Malolactic Activity Is a Characteristic of H⁺-ATPase-Deficient Mutants of the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. Appl Environ Microbiol 69:1973–1979. doi: 10.1128/AEM.69.4.1973-1979.2003

- Gámbaro A, Boido E, Zlotejablko A, Medina K, Lloret A, Dellacassa E, Carrau F (2001) Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust J Grape Wine Res* 7:27–32.
- Garcia-Moruno E, Muñoz R (2012) Does *Oenococcus oeni* produce histamine? *Int J Food Microbiol* 157:121–129. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.013
- Garmyn D, Monnet C, Martineau B, Guzzo J, Cavin J-F, Diviès C (1996) Cloning and sequencing of the gene encoding α -acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*. *FEMS Microbiol Lett* 145:445–450. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08614.x
- Garvie EI (1967a) The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp.nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J Gen Microbiol* 48:439–447.
- Garvie EI (1986) Genus *Leuconostoc*. *Bergeys Man. Syst. Bacteriol.* 1071–1075.
- Garvie EI (1967b) *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J Gen Microbiol* 48:431–438. doi: 10.1099/00221287-48-3-431
- Georg J, Hess WR (2011) cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:286–300. doi: 10.1128/MMBR.00032-10
- Gerth U, Krüger E, Derré I, Msadek T, Hecker M (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol* 28:787–802. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00840.x
- Gerth U, Wipat A, Harwood CR, Carter N, Emmerson PT, Hecker M (1996) Sequence and transcriptional analysis of *clpX*, a class-III heat-shock gene of *Bacillus subtilis*. *Gene* 181:77–83.
- Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ziebandt A-K, Tischer K, Scharf C, Hacker J, Hecker M (2000) Characterization of the ζ B Regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182:6983–6991.
- Gindreau E, Lonvaud-Funel A (1999) Molecular analysis of the region encoding the lytic system from *Oenococcus oeni* temperate bacteriophage ϕ 10MC. *FEMS Microbiol Lett* 171:231–238. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13437.x
- Gindreau E, Torlois S, Lonvaud-Funel A (1997) Identification and sequence analysis of the region encoding the site-specific integration system from *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) temperate bacteriophage ϕ 10MC. *FEMS Microbiol Lett* 147:279–285. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10254.x
- Gómez-Míguez MJ, Cacho JF, Ferreira V, Vicario IM, Heredia FJ (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem* 100:1464–1473.

- Good L (2003) Translation repression by antisense sequences. *Cell Mol Life Sci CMLS* 60:854–861. doi: 10.1007/s00018-003-3045-4
- Gosalbes MJ, Esteban CD, Galán JL, Pérez-Martínez G (2000) Integrative Food-Grade Expression System Based on the Lactose Regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 66:4822–4828.
- Gottesman S, Clark WP, Crecy-Lagard V de, Maurizi MR (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and in vivo activities. *J Biol Chem* 268:22618–22626.
- Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* 11:815–823. doi: 10.1101/gad.11.7.815
- Grandvalet C (2011) Bases moléculaires de la réponse aux stress chez *Oenococcus oeni*, une bactérie d'intérêt oenologique. Habilitation à Diriger des Recherches de l'Université de Bourgogne.
- Grandvalet C, Assad-García JS, 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. doi: 10.1099/mic.0.2007/016238-0
- Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, Guzzo J (2005) CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J Bacteriol* 187:5614–5623. doi: 10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005
- Grandvalet C, De Crécy-Lagard V, Mazodier P (1999) The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol Microbiol* 31:521–532. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01193.x
- Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005a) Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J Appl Microbiol* 99:1061–1069. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02707.x
- Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005b) A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 105:233–244. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.011
- Gruss A, Ehrlich SD (1989) The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol Rev* 53:231–241.
- Guérout-Fleury A-M, Frandsen N, Stragier P (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180:57–61. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00404-0
- Guerrini S, Mangani S, Granchi L, Vincenzini M (2002) Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* 44:374–378. doi: 10.1007/s00284-001-0021-9

- Guzzo J, Cavin JF, Diviès C (1994) Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnol Lett* 16:1189–1194. doi: 10.1007/BF01020849
- Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin M-P, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin J-F, Diviès 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. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00042.x
- Guzzo J, Jobin M-P, Delmas F, Fortier L-C, 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. *Int J Food Microbiol* 55:27–31. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00209-9
- Guzzo J, Jobin M-P, Diviès C (1998) Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiol Lett* 160:43–47. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12888.x

H

- Halász A, Baráth Á, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol* 5:42–49. doi: 10.1016/0924-2244(94)90070-1
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571–580. doi: 10.1038/381571a0
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16:574–581. doi: 10.1038/nsmb.1591
- Hecker M, Schumann W, Völker U (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417–428. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x
- Herrero M, García LA, Díaz M (2004) Malolactic bioconversion using a *Oenococcus oeni* strain for cider production: effect of yeast extract supplementation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:699–704. doi: 10.1007/s10295-003-0102-9
- Hirayama K, Rafter J (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2:681–686. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00357-9
- Hols P, Defrenne C, Ferain T, Derzelle S, Delplace B, Delcour J (1997) The alanine racemase gene is essential for growth of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 179:3804–3807.
- Holzapfel WHN, Wood BJB (2012) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer Science & Business Media
- Horwitz J (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10449–10453.

- Hoskins JR, Doyle SM, Wickner S (2009) Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA⁺ protein. *Proc Natl Acad Sci* 106:22233–22238. doi: 10.1073/pnas.0911937106
- Hou X-H, Zhang J-Q, Song X-Y, Ma X-B, Zhang S-Y (2014) Contribution of ClpP to stress tolerance and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *J Basic Microbiol* n/a–n/a. doi: 10.1002/jobm.201300747
- Huang DC, Huang XF, Novel G, Novel M (1993) Two genes present on a transposon-like structure in *Lactococcus lactis* are involved in a Clp-family proteolytic activity. *Mol Microbiol* 7:957–965. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01187.x
- Hüfner E, Markieton T, Chaillou S, Coq A-MC-L, Zagorec M, Hertel C (2007) Identification of *Lactobacillus sakei* Genes Induced during Meat Fermentation and Their Role in Survival and Growth. *Appl Environ Microbiol* 73:2522–2531. doi: 10.1128/AEM.02396-06
- Hühne K, Axelsson L, Holck A, Kröckel L (1996) Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. *Microbiology* 142:1437–1448. doi: 10.1099/13500872-142-6-1437

I

- Ibrahim YM, Kerr AR, McCluskey J, Mitchell TJ (2004a) Role of HtrA in the Virulence and Competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 72:3584–3591. doi: 10.1128/IAI.72.6.3584-3591.2004
- Ibrahim YM, Kerr AR, McCluskey J, Mitchell TJ (2004b) Control of Virulence by the Two-Component System CiaR/H Is Mediated via HtrA, a Major Virulence Factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 186:5258–5266. doi: 10.1128/JB.186.16.5258-5266.2004
- Ingmer H, Vogensen FK, Hammer K, Kilstrup M (1999) Disruption and Analysis of the clpB, clpC, and clpE Genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a New Clp Family in Gram-Positive Bacteria. *J Bacteriol* 181:2075–2083.
- Ito F, Tamiya T, Ohtsu I, Fujimura M, Fukumori F (2014) Genetic and phenotypic characterization of the heat shock response in *Pseudomonas putida*. *MicrobiologyOpen* 3:922–936. doi: 10.1002/mbo3.217

J

- Janda I, Devedjiev Y, Derewenda U, Dauter Z, Bielnicki J, Cooper DR, Graf PCF, Joachimiak A, Jakob U, Derewenda ZS (2004) The Crystal Structure of the Reduced, Zn²⁺-Bound Form of the *B. subtilis* Hsp33 Chaperone and Its Implications for the Activation Mechanism. *Struct Lond Engl* 1993 12:1901–1907. doi: 10.1016/j.str.2004.08.003

- Janse BJH, Wingfield BD, Pretorius IS, van Vuuren HJJ (1987) Plasmids in *Leuconostoc oenos*. Plasmid 17:173–175. doi: 10.1016/0147-619X(87)90025-4
- Janska H, Kwasniak M, Szczepanowska J (2013) Protein quality control in organelles — AAA/FtsH story. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res 1833:381–387. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.016
- Jaomanjaka F, Ballestra P, Dols-lafargue M, Le Marrec C (2013) Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: Insights into a novel group based on the integrase sequence. Int J Food Microbiol 166:331–340. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.032
- Ji J, Wernli M, Klimkait T, Erb P (2003) Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. FEBS Lett 552:247–252. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00893-7
- Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Diviès C, 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.
- Jobin M-P, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J (1999a) Expression of the *Oenococcus oeni* trxA gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. Microbiology 145:1245–1251. doi: 10.1099/13500872-145-5-1245
- Jobin M-P, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J (1999b) The *Oenococcus oeni* clpX Homologue Is a Heat Shock Gene Preferentially Expressed in Exponential Growth Phase. J Bacteriol 181:6634–6641.

K

- Kajfasz JK, Martinez AR, Rivera-Ramos I, Abranches J, Koo H, Quivey RG, Lemos JA (2009) Role of Clp Proteins in Expression of Virulence Properties of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 191:2060–2068. doi: 10.1128/JB.01609-08
- Kammerer B (1996) La génétique des lactobacilles, leuconostocs et pédiocoques: criblage, sélection et construction de mutants. Le Lait 76:51–66. doi: 10.1051/lait:19961-26
- Kannan TR, Musatovova O, Gowda P, Baseman JB (2008) Characterization of a Unique ClpB Protein of *Mycoplasma pneumoniae* and Its Impact on Growth. Infect Immun 76:5082–5092. doi: 10.1128/IAI.00698-08
- Karatzas KAG, Bennik MHJ (2002) Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A Isolate with High Tolerance towards High Hydrostatic Pressure. Appl Environ Microbiol 68:3183–3189. doi: 10.1128/AEM.68.7.3183-3189.2002
- Karatzas KAG, Wouters JA, Gahan CGM, Hill C, Abee T, Bennik MHJ (2003) The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. Mol Microbiol 49:1227–1238. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03636.x

- Karimova G, Dautin N, Ladant D (2005) Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. *J Bacteriol* 187:2233–2243. doi: 10.1128/JB.187.7.2233-2243.2005
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5752–5756.
- Karimova G, Ullmann A, Ladant D (2000) [5] A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. In: Jeremy Thorner SDE and JNA (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 59–73
- Kaswurm V, Nguyen T-T, Maischberger T, Kulbe KD, Michlmayr H (2013) Evaluation of the food grade expression systems NICE and pSIP for the production of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase from *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express* 3:7. doi: 10.1186/2191-0855-3-7
- Kessel M, Maurizi MR, Kim B, Kocsis E, Trus BL, Singh SK, Steven AC (1995) Homology in Structural Organization Between *E. coli* ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome. *J Mol Biol* 250:587–594. doi: 10.1006/jmbi.1995.0400
- Kim DY, Kim KK (2005) Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* 38:266–274.
- Kim KI, Cheong G-W, Park S-C, Ha J-S, Woo KM, Choi SJ, Chung CH (2000) Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303:655–666. doi: 10.1006/jmbi.2000.4165
- Kim SG, Batt CA (1991) Antisense mRNA-Mediated Bacteriophage Resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 57:1109–1113.
- Kim Y-I, Levchenko I, Fraczowska K, Woodruff RV, Sauer RT, Baker TA (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Mol Biol* 8:230–233. doi: 10.1038/84967
- Kirstein J, Dougan DA, Gerth U, Hecker M, Turgay K (2007) The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *EMBO J* 26:2061–2070. doi: 10.1038/sj.emboj.7601655
- Kirstein J, Hoffmann A, Lilie H, Schmidt R, Rübsamen-Waigmann H, Brötz-Oesterhelt H, Mogk A, Turgay K (2009) The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol Med* 1:37–49. doi: 10.1002/emmm.200900002
- Kirstein J, Schlothauer T, Dougan DA, Lilie H, Tischendorf G, Mogk A, Bukau B, Turgay K (2006) Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J* 25:1481–1491. doi: 10.1038/sj.emboj.7601042

- Kirstein J, Zühlke 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*. *EMBO J* 24:3435–3445. doi: 10.1038/sj.emboj.7600780
- Klaenhammer T, Altermann E, Arigoni F, Bolotin A, Breidt F, Broadbent J, Cano R, Chaillou S, Deutscher J, Gasson M, Guchte M van de, Guzzo J, Hartke A, Hawkins T, Hols P, Hutkins R, Kleerebezem M, Kok J, Kuipers O, Lubbers M, Maguin E, McKay L, Mills D, Nauta A, Overbeek R, Pel H, Pridmore D, Saier M, Sinderen D van, Sorokin A, Steele J, O’Sullivan D, Vos W de, Weimer B, Zagorec M, Siezen R (2002) Discovering lactic acid bacteria by genomics. In: Siezen RJ, Kok J, Abee T, Schasfsma G (eds) *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer Netherlands, pp 29–58
- Kochan TJ, Dawid S (2013) The HtrA Protease of *Streptococcus pneumoniae* Controls Density-Dependent Stimulation of the Bacteriocin blp Locus via Disruption of Pheromone Secretion. *J Bacteriol* 195:1561–1572. doi: 10.1128/JB.01964-12
- Kock H, Gerth U, Hecker M (2004) The ClpP Peptidase Is the Major Determinant of Bulk Protein Turnover in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186:5856–5864. doi: 10.1128/JB.186.17.5856-5864.2004
- Kress W, Maglica Ž, Weber-Ban E (2009) Clp chaperone–proteases: structure and function. *Res Microbiol* 160:618–628. doi: 10.1016/j.resmic.2009.08.006
- Krüger E, Hecker M (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* clpC operon, ctsR, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* 180:6681–6688.
- Krüger Ei, Msadek T, Ohlmeier S, Hecker M (1997) The *Bacillus subtilis* clpC operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* 143:1309–1316. doi: 10.1099/00221287-143-4-1309
- Krüger E, Völker U, Hecker M (1994) Stress induction of clpC in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* 176:3360–3367.
- Krüger E, Witt E, Ohlmeier S, Hanschke R, Hecker M (2000) The Clp Proteases of *Bacillus subtilis* Are Directly Involved in Degradation of Misfolded Proteins. *J Bacteriol* 182:3259–3265. doi: 10.1128/JB.182.11.3259-3265.2000
- Krüger E, Zühlke D, Witt E, Ludwig H, Hecker M (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J* 20:852–863. doi: 10.1093/emboj/20.4.852
- Kunkee RE (1991) Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol Rev* 8:55–72. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04957.x
- Kwon H-Y, Kim S-W, Choi M-H, Ogunniyi AD, Paton JC, Park S-H, Pyo S-N, Rhee D-K (2003) Effect of Heat Shock and Mutations in ClpL and ClpP on Virulence Gene Expression in

Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 71:3757–3765. doi: 10.1128/IAI.71.7.3757-3765.2003

L

Labarre C, Diviès C, Guzzo J (1996a) Genetic organization of the mle locus and identification of a mleR-like gene from *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 62:4493–4498.

Labarre C, Guzzo J, Cavin JF, Diviès C (1996b) Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 62:1274–1282.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.

Law J, Buist G, Haandrikman A, Kok J, Venema G, Leenhouts K (1995a) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. J Bacteriol 177:7011–7018.

Law J, Buist G, Haandrikman A, Kok J, Venema G, Leenhouts K (1995b) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. J Bacteriol 177:7011–7018.

Le Chatelier E, Ehrlich SD, Jannièrè L (1993) Biochemical and Genetic Analysis of the Unidirectional Theta Replication of the *S. agalactiae* Plasmid pIP501. Plasmid 29:50–56. doi: 10.1006/plas.1993.1006

Lee J, Kim J-H, Biter AB, Sielaff B, Lee S, Tsai FTF (2013) Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. Proc Natl Acad Sci 110:8513–8518. doi: 10.1073/pnas.1217988110

Lee S, Sowa ME, Watanabe Y, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, Tsai FTF (2003) The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone that Rescues Proteins from an Aggregated State. Cell 115:229–240. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00807-9

Lemme A, Sztajer H, Wagner-Döbler I (2010) Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. BMC Microbiol 10:58. doi: 10.1186/1471-2180-10-58

Lemos JAC, Burne RA (2002) Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 184:6357–6366. doi: 10.1128/JB.184.22.6357-6366.2002

Lentze N, Studer S, Narberhaus 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. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00356-5

- Lilly M, Bauer FF, Lambrechts MG, Swiegers JH, Cozzolino D, Pretorius IS (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23:641–659.
- Lipinska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* htrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171:1574–1584.
- Lipinska B, Sharma S, Georgopoulos C (1988) Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 16:10053–10067.
- Lipinska B, Zylicz M, Georgopoulos C (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol* 172:1791–1797.
- Li T, Lin J, Lucius AL (2015a) Examination of polypeptide substrate specificity for *Escherichia coli* ClpB. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 83:117–134. doi: 10.1002/prot.24710
- Li T, Weaver CL, Lin J, Duran EC, Miller JM, Lucius AL (2015b) *Escherichia coli* ClpB is a non-processive polypeptide translocase. *Biochem J* 470:39–52. doi: 10.1042/BJ20141457
- Liu J, Cosby WM, Zuber P (1999) Role of Lon and ClpX in the post-translational regulation of a sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 33:415–428. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01489.x
- Lizier M, Sarra PG, Cauda R, Lucchini F (2010) Comparison of expression vectors in *Lactobacillus reuteri* strains. *FEMS Microbiol Lett* 308:8–15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01978.x
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317–331.
- Lonvaud-Funel A (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 199:9–13.
- López-Aguilar C, Romero-López C, Espinosa M, Berzal-Herranz A, Del Solar G (2015) The 5'-tail of antisense RNAII of pMV158 plays a critical role in binding to the target mRNA and in translation inhibition of repB. *Front Genet* 6:225. doi: 10.3389/fgene.2015.00225
- Loubiere P, Salou P, Leroy MJ, Lindley ND, Pareilleux A (1992) Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J Bacteriol* 174:5302–5308.
- Lourdault K, Cerqueira GM, Wunder EA, Picardeau M (2011) Inactivation of clpB in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. *Infect Immun* 79:3711–3717. doi: 10.1128/IAI.05168-11

- Lu S, Nie Y, Tang Y-Q, Xiong G, Wu X (2014) A critical combination of operating parameters can significantly increase the electrotransformation efficiency of a gram-positive *Dietzia* strain. *J Microbiol Methods*. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.015
- Lu Y-J, Rock CO (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 59:551–566. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04951.x
- Lyon WR, Caparon MG (2004) Role for Serine Protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the Biogenesis of Virulence Factors SpeB and the Hemolysin Streptolysin S. *Infect Immun* 72:1618–1625. doi: 10.1128/IAI.72.3.1618-1625.2004.

M

- Maicas S, Gil J-V, Pardo I, Ferrer S (1999) Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res Int* 32:491–496.
- Maicas S, Mateo JJ (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:322–335. doi: 10.1007/s00253-004-1806-0
- Maischberger T, Mierau I, Peterbauer CK, Hugenholtz J, Haltrich D (2010) High-Level Expression of *Lactobacillus* β -Galactosidases in *Lactococcus lactis* Using the Food-Grade, Nisin-Controlled Expression System NICE. *J Agric Food Chem* 58:2279–2287.
- Maitre M (2012) Le chaperon moléculaire Lo18 de *Oenococcus oeni*: Caractérisation de ses activités en lien avec sa plasticité oligomérique. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne.
- Maitre M, Weidmann S, Dubois-Brissonnet F, David V, Coves J, Guzzo J (2014) Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small Heat Shock Protein Lo18 in membrane integrity. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.04178-13
- 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. *Biochem J* 444:97–104. doi: 10.1042/BJ20120066
- Makarova KS, Koonin EV (2007) Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J Bacteriol* 189:1199–1208. doi: 10.1128/JB.01351-06
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006)

- Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15611–15616. doi: 10.1073/pnas.0607117103
- Man S, Cheng R, Miao C, Gong Q, Gu Y, Lu X, Han F, Yu W (2011) Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria. *Nucleic Acids Res* 39:e50. doi: 10.1093/nar/gkr034
- Marcobal A, Martín-Alvarez PJ, Polo MC, Muñoz R, Moreno-Arribas MV (2006) Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J Food Prot* 69:397–404.
- Marcobal AM, Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, Mills DA (2008) Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J Bacteriol* 190:564–570. doi: 10.1128/JB.01457-07
- Mascher T (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 264:133–144. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00444.x
- Matthews A, Grbin PR, Jiranek V (2006) A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust J Grape Wine Res* 12:235–244.
- Matthews A, Grbin PR, Jiranek V (2007) Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:329–337.
- Matthews A, Grimaldi A, Walker M, Bartowsky E, Grbin P, Jiranek V (2004) Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Appl Environ Microbiol* 70:5715–5731.
- McGarry TJ, Lindquist S (1986) Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:399–403.
- McGrath S, Fitzgerald GF, Sinderen D van (2001) Improvement and Optimization of Two Engineered Phage Resistance Mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67:608–616. doi: 10.1128/AEM.67.2.608-616.2001
- Mendoza JA, Rogers E, Lorimer GH, Horowitz PM (1991) Chaperonins facilitate the *in vitro* folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J Biol Chem* 266:13044–13049.
- Mesas J m., Rodríguez M c., Alegre M t. (2011) Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett Appl Microbiol* 52:258–268. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02991.x
- Mesas J m., Rodríguez M c., Alegre M t. (2012) Basic characterization and partial purification of β -glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81. *Lett Appl Microbiol* 55:247–255.

- Mesas JM, Rodríguez MC, Alegre MT (2001) Nucleotide Sequence Analysis of pRS2 and pRS3, Two Small Cryptic Plasmids from *Oenococcus oeni*. *Plasmid* 46:149–151. doi: 10.1006/plas.2001.1537
- Mesas JM, Rodríguez MC, Alegre MT (2004) Plasmid curing of *Oenococcus oeni*. *Plasmid* 51:37–40. doi: 10.1016/S0147-619X(03)00074-X
- Michlmayr H, Kneifel W (2013) β -glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol Lett* 352:1–10.
- Michlmayr H, Nauer S, Brandes W, Schumann C, Kulbe KD, del Hierro AM, Eder R (2012) Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chem* 135:80–87.
- Michlmayr H, Schumann C, Wurbs P, Barreira Braz da Silva NM, Rogl V, Kulbe KD, del Hierro AM (2010) A β -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: Cloning and expression in *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1281–1289.
- Mierau I, Olieman K, Mond J, Smid EJ (2005) Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb Cell Factories* 4:16. doi: 10.1186/1475-2859-4-16
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harb. Lab. Press
- Mills DA (2004) The Lactic Acid Bacteria Genome Project. *J Food Sci* 69:FMS28–FMS30. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb17873.x
- Mogk A, Homuth G, Scholz C, Kim L, Schmid FX, Schumann W (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 16:4579–4590. doi: 10.1093/emboj/16.15.4579
- Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rüdiger S, Röder D, Langen H, Bukau B (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* 18:6934–6949. doi: 10.1093/emboj/18.24.6934
- Mohedano M de la L, Russo P, Ríos V de los, Capozzi V, Palencia PF de, Spano G, López P (2014) A partial proteome reference map of the wine lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163. *Open Biol* 4:130154. doi: 10.1098/rsob.130154
- Molière N, Turgay K (2009) Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 160:637–644. doi: 10.1016/j.resmic.2009.08.020
- Morel F, Delmas F, Jobin M-P, Diviès C, Guzzo J (2001) Improved acid tolerance of a recombinant strain of *Escherichia coli* expressing genes from the acidophilic bacterium *Oenococcus oeni*. *Lett Appl Microbiol* 33:126–130. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00960.x

- Morse R, Collins MD, O'hanlon K, Wallbanks S, Richardson PT (1996) Analysis of the β' Subunit of DNA-Dependent RNA Polymerase Does Not Support the Hypothesis Inferred from 16S rRNA Analysis that *Oenococcus oeni* (Formerly *Leuconostoc oenos*) Is a Tachytelic (Fast-Evolving) Bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 46:1004–1009.
- Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud M-L, Denizot F, Rapoport G (1998) ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 27:899–914. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00735.x
- Msadek T, Kunst F, Rapoport G (1994) MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci* 91:5788–5792.
- ### N
- Nair S, Derré I, Msadek T, Gaillot O, Berche P (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 35:800–811.
- 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*. *Mol Microbiol* 31:185–196. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01159.x
- Nair S, Poyart C, Beretti J-L, Veiga-Fernandes H, Berche P, Trieu-Cuot P (2003) Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiol Read Engl* 149:407–417.
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24:34–35.
- Nakamoto H, Vigh L (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64:294–306. doi: 10.1007/s00018-006-6321-2
- Narberhaus F (2002) α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:64–93. doi: 10.1128/MMBR.66.1.64-93.2002
- Nascimento JG, Guerreiro-Pereira MC, Costa SF, São-José C, Santos MA (2008) Nisin-Triggered Activity of Lys44, the Secreted Endolysin from *Oenococcus oeni* Phage fOg44. *J Bacteriol* 190:457–461. doi: 10.1128/JB.01195-07
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Res* 9:27–43. doi: 10.1101/gr.9.1.27
- Nguyen CT, Le N-T, Tran TD-H, Kim E-H, Park S-S, Luong TT, Chung K-T, Pyo S, Rhee D-K (2014) *S. pneumoniae* ClpL modulates adherence to A549 human lung cells through Rap1/Rac1 activation. *Infect Immun IAI*.02012–14. doi: 10.1128/IAI.02012-14

Nguyen T-T, Mathiesen G, Fredriksen L, Kittl R, Nguyen T-H, Eijssink VGH, Haltrich D, Peterbauer CK (2011) A Food-Grade System for Inducible Gene Expression in *Lactobacillus plantarum* Using an Alanine Racemase-Encoding Selection Marker. *J Agric Food Chem* 59:5617–5624.

Nilsson D, Lauridsen AA, Tomoyasu T, Ogura T (1994) A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* ftsH gene product. *Microbiol Read Engl* 140 (Pt 10):2601–2610.

O

Oddone GM, Mills DA, Block DE (2009) Dual inducible expression of recombinant GFP and targeted antisense RNA in *Lactococcus lactis*. *Plasmid* 62:108–118. doi: 10.1016/j.plasmid.2009.06.002

Olguín N, Bordons A, Reguant C (2009) Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* 26:197–203. doi: 10.1016/j.fm.2008.09.004

Olguín N, Bordons A, Reguant C (2010) Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *Int J Food Microbiol* 144:88–95.

Olguín N, Champomier-Vergès M, Anglade P, Baraige F, Cordero-Otero R, Bordons A, Zagorec M, Reguant C (2015) Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock. *Food Microbiol* 51:87–95. doi: 10.1016/j.fm.2015.05.005

Oraby M (2002) Caractérisation du plasmide pLC22R de *Leuconostoc citreum* et développement d'outils génétiques spécifiques aux bactéries du genre *Leuconostoc*. Université de Bourgogne

Orberg PK, Sandine WE (1984) Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl Environ Microbiol* 48:1129–1133.

Ortega J, Iwanczyk J, Jomaa A (2009) *Escherichia coli* DegP: a Structure-Driven Functional Model. *J Bacteriol* 191:4705–4713. doi: 10.1128/JB.00472-09.

P

Pallen MJ, Wren BW (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol* 26:209–221. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.5601928.x

Parish T, Stoker NG (1997) Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 154:151–157. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12637.x

- Park S-S, Kwon H-Y, Tran TD-H, Choi M-H, Jung S-H, Lee S, Briles DE, Rhee D-K (2015) ClpL is a chaperone without auxiliary factors. *FEBS J* 282:1352–1367. doi: 10.1111/febs.13228
- Parreira R, São-José C, Isidro A, Domingues S, Vieira G, Santos MA (1999) Gene organization in a central DNA fragment of *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 encoding lytic, integrative and non-essential functions. *Gene* 226:83–93. doi: 10.1016/S0378-1119(98)00554-X
- Pasteur L (1866) Etudes sur le vin. Ses maladies, causes qui les provoquent. Procédés nouveaux pour le conserver et le vieillir. Imprimerie impériale, Paris, France
- Pérez-Arellano I, Zúñiga M, Pérez-Martínez G (2001) Construction of Compatible Wide-Host-Range Shuttle Vectors for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* 46:106–116. doi: 10.1006/plas.2001.1531
- Pérez-Martín F, Seseña S, Izquierdo PM, Martín R, Palop ML (2011) Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1423–1432. doi: 10.1007/s11274-011-0942-9
- Persuh M, Mandic-Mulec I, Dubnau D (2002) A MecA Paralog, YpbH, Binds ClpC, Affecting both Competence and Sporulation. *J Bacteriol* 184:2310–2313. doi: 10.1128/JB.184.8.2310-2313.2002
- Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D (2011) Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol J* 6:1147–1161.
- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Volker U, Hecker M (2001) Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:5617–5631. doi: 10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001
- Poblet-Icart M, Bordons A, Lonvaud-Funel A (1998) Lysogeny of *Oenococcus oeni* (syn. *Leuconostoc oenos*) and study of their induced bacteriophages. *Curr Microbiol* 36:365–369.
- Poquet I, Saint V, Sez nec E, Simoes N, Bolotin A, Gruss A (2000) HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol* 35:1042–1051. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01757.x
- Porankiewicz J, Wang J, Clarke AK (1999) New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* 32:449–458. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01357.x
- Porrini L, Cybulski LE, Altabe SG, Mansilla MC, de Mendoza D (2014) Cerulenin inhibits unsaturated fatty acids synthesis in *Bacillus subtilis* by modifying the input signal of DesK thermosensor. *MicrobiologyOpen* 3:213–224. doi: 10.1002/mbo3.154

Pozo-Bayón MA, G-Alegría E, Polo MC, Tenorio C, Martín-Álvarez PJ, Calvo de la Banda MT, Ruiz-Larrea F, Moreno-Arribas MV (2005) Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. J Agric Food Chem 53:8729–8735.

Pujol C, Chédin F, Ehrlich SD, Jannièrè L (1998) Inhibition of a naturally occurring rolling-circle replicon in derivatives of the theta-replicating plasmid pIP501. Mol Microbiol 29:709–718. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00940.x

R

Ramos A, Lolkema JS, Konings WN, Santos H (1995) Enzyme Basis for pH Regulation of Citrate and Pyruvate Metabolism by *Leuconostoc oenos*. Appl Environ Microbiol 61:1303–1310.

Ranson NA, Clare DK, Farr GW, Houldershaw D, Horwich AL, Saibil HR (2006) Allosteric signalling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes. Nat Struct Mol Biol 13:147–152. doi: 10.1038/nsmb1046

Rasmussen LCV, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK (2007) Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. Microb Cell Factories 6:24. doi: 10.1186/1475-2859-6-24

Remize F, Gaudin A, Kong Y, Guzzo J, Alexandre H, Krieger S, Guilloux-Benatier M (2006) *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. Arch Microbiol 185:459–469. doi: 10.1007/s00203-006-0116-6

Renault P, Gaillardin C, Heslot H (1989) Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators. J Bacteriol 171:3108–3114.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (2006) Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons

Riethdorf S, Völker U, Gerth U, Winkler A, Engelmann S, Hecker M (1994) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* lon gene. J Bacteriol 176:6518–6527.

Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. Experientia 18:571–573. doi: 10.1007/BF02172188

Ritossa F (1996) Discovery of the heat shock response. Cell Stress Chaperones 1:97–98.

Robertson GT, Ng W-L, Foley J, Gilmour R, Winkler ME (2002) Global Transcriptional Analysis of clpP Mutations of Type 2 *Streptococcus pneumoniae* and Their Effects on Physiology and Virulence. J Bacteriol 184:3508–3520. doi: 10.1128/JB.184.13.3508-3520.2002

- Robertson GT, Ng W-L, Gilmour R, Winkler ME (2003) Essentiality of *clpX*, but Not *clpP*, *clpL*, *clpC*, or *clpE*, in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 185:2961–2966. doi: 10.1128/JB.185.9.2961-2966.2003
- Rodríguez MC, Alegre MT, Martín MC, Mesas JM (2015) The use of the replication region of plasmid pRS7 from *Oenococcus oeni* as a putative tool to generate cloning vectors for lactic acid bacteria. *Plasmid* 77:28–31. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.11.004
- Romano A, Trip H, Lonvaud-Funel A, Lolkema JS, Lucas PM (2012) Evidence of Two Functionally Distinct Ornithine Decarboxylation Systems in Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 78:1953–1961. doi: 10.1128/AEM.07161-11
- Roncarati D, Danielli A, Scarlato V (2014) The HrcA repressor is the thermosensor of the heat-shock regulatory circuit in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 92:910–920. doi: 10.1111/mmi.12600
- Ronez F, Desroche N, Arbault P, Guzzo J (2012) Co-expression of the small heat shock protein, Lo18, with β -glucosidase in *Escherichia coli* improves solubilization and reveals various associations with overproduced heterologous protein, GroEL/ES. *Biotechnol Lett* 34:935–939. doi: 10.1007/s10529-012-0854-2
- Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G (2001) Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol Ecol* 36:211–222. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00842.x

S

- Saerens SMG, Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Voet ARD, Van Dijck P, Delvaux FR, Thevelein JM (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem* 281:4446–4456.
- Saibil HR, Fenton WA, Clare DK, Horwich AL (2013) Structure and Allostery of the Chaperonin GroEL. *J Mol Biol* 425:1476–1487. doi: 10.1016/j.jmb.2012.11.028
- Salema M, Capucho I, Poolman B, Romão MVS, Dias MC (1996a) In vitro reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J Bacteriol* 178:5537–5539.
- Salema M, Lolkema JS, San Romão MV, Lourero Dias MC (1996b) The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J Bacteriol* 178:3127–3132.
- Salema M, Poolman B, Lolkema JS, Dias MCL, Konings WN (1994) Uniport of Monoanionic L-malate in Membrane Vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur J Biochem* 225:289–295. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00289.x
- Santos R, São-José C, Vieira G, Paveia H, Santos MA (1998) Genome diversity in temperate bacteriophages of *Oenococcus oeni*. *Arch Virol* 143:523–536.

- Santos R, Vieira G, Santos M a., Paveia H (1996) Characterization of temperate bacteriophages of *Leuconostoc oenos* and evidence for two prophage attachment sites in the genome of starter strain PSU-1. J Appl Bacteriol 81:383–392. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03523.x
- São-José C, Parreira R, Vieira G, Santos MA (2000) The N-Terminal Region of the *Oenococcus oeni* Bacteriophage fOg44 Lysin Behaves as a Bona Fide Signal Peptide in *Escherichia coli* and as a cis-Inhibitory Element, Preventing Lytic Activity on Oenococcal Cells. J Bacteriol 182:5823–5831. doi: 10.1128/JB.182.20.5823-5831.2000
- São-José C, Santos S, Nascimento J, Brito-Madurro AG, Parreira R, Santos MA (2004) Diversity in the lysis-integration region of oenophage genomes and evidence for multiple tRNA loci, as targets for prophage integration in *Oenococcus oeni*. Virology 325:82–95. doi: 10.1016/j.virol.2004.04.029
- Sassoon N, Arié J-P, Betton J-M (1999) PDZ domains determine the native oligomeric structure of the DegP (HtrA) protease. Mol Microbiol 33:583–589. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01505.x
- Sauer U, Dürre P (1993) Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol 175:3394–3400.
- Sauvageot F, Vivier P (1997) Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines. Am J Enol Vitic 48:187–192.
- Schmidt R, Decatur AL, Rather PN, Moran CP, Losick R (1994) *Bacillus subtilis* lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor sigma G. J Bacteriol 176:6528–6537.
- Schulz A, Schwab S, Homuth G, Versteeg S, Schumann W (1997) The htpG gene of *Bacillus subtilis* belongs to class III heat shock genes and is under negative control. J Bacteriol 179:3103–3109.
- Schümann C, Michlmayr H, del Hierro AM, Kulbe KD, Jiranek V, Eder R, Nguyen T-H (2013) Malolactic enzyme from *Oenococcus oeni*. Bioengineered 4:147–152. doi: 10.4161/bioe.22988
- Schümann C, Michlmayr H, Eder R, del Hierro AM, Kulbe KD, Mathiesen G, Nguyen T-H (2012) Heterologous expression of *Oenococcus oeni* malolactic enzyme in *Lactobacillus plantarum* for improved malolactic fermentation. AMB Express 2:19.
- Schumann W (2009) Chapter 7 Temperature Sensors of Eubacteria. In: Allen I. Laskin SS and GMG (ed) Advances in Applied Microbiology. Academic Press, pp 213–256
- Schumann W (2007) Thermosensors in eubacteria: role and evolution. J Biosci 32:549–557.
- Schumann W (2003) The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. Cell Stress Chaperones 8:207–217.

- Servant P, Grandvalet C, Mazodier P (2000) The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. Proc Natl Acad Sci U S A 97:3538–3543.
- Servant P, Mazodier P (1996) Heat induction of hsp18 gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation. J Bacteriol 178:7031–7036.
- Sharma SK, 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. Nat Chem Biol 6:914–920. doi: 10.1038/nchembio.455
- Shinitzky M, Barenholz Y (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr 515:367–394. doi: 10.1016/0304-4157(78)90010-2
- Siebert TE, Smyth HE, Capone DL, Neuwöhner C, Pardon KH, Skouroumounis GK, Herderich MJ, Sefton MA, Pollnitz AP (2005) Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. Anal Bioanal Chem 381:937–947.
- Sielaff B, Tsai FTF (2010) The M-Domain Controls Hsp104 Protein Remodeling Activity in an Hsp70/Hsp40-Dependent Manner. J Mol Biol 402:30–37. doi: 10.1016/j.jmb.2010.07.030
- Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, Hijum SAFT van (2012) Complete Resequencing and Reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Genome. J Bacteriol 194:195–196. doi: 10.1128/JB.06275-11
- Silva I, Campos F m., Hogg T, Couto J a. (2011) Wine phenolic compounds influence the production of volatile phenols by wine-related lactic acid bacteria. J Appl Microbiol 111:360–370. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05052.x
- Simmons LA, Grossman AD, Walker GC (2008) Clp and Lon Proteases Occupy Distinct Subcellular Positions in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 190:6758–6768. doi: 10.1128/JB.00590-08
- Simões C, Alakomi H, Maukonen J, Saarela M (2010) Expression of *clpL1* and *clpL2* genes in *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 after exposure to acid and heat stress treatments or to freeze-drying. Benef Microbes 1:253–257. doi: 10.3920/BM2010.0021
- Simons RW, Kleckner N (1988) Biological Regulation by Antisense RNA in Prokaryotes. Annu Rev Genet 22:567–600. doi: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003031
- Singh R, Jiang X (2015) Expression of Stress and Virulence Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Heat Shocked in Fresh Dairy Compost. J Food Prot 78:31–41. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-529
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (eds) (1989) Approved Lists of Bacterial Names (Amended). ASM Press, Washington (DC)

- Skórko-Glonek J, Lipińska B, Krzewski K, Zolese G, Bertoli E, Tanfani F (1997) HtrA Heat Shock Protease Interacts with Phospholipid Membranes and Undergoes Conformational Changes. *J Biol Chem* 272:8974–8982. doi: 10.1074/jbc.272.14.8974
- Skórko-Glonek J, Wawrzynów A, Krzewski K, Kurpierz K, Lipińska B (1995) Site-directed mutagenesis of the HtrA(DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. *Gene* 163:47–52. doi: 10.1016/0378-1119(95)00406-V
- Somkuti GA, Solaiman DKY, Steinberg DH (1998) Structural and Functional Properties of the hsp16.4-Bearing Plasmid pER341 in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* 40:61–72. doi: 10.1006/plas.1998.1352
- Sørvig E, Grönqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VGH, Axelsson L (2003) Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 229:119–126.
- Sørvig E, Mathiesen G, Naterstad K, Eijsink VGH, Axelsson L (2005) High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. *Microbiology* 151:2439–2449.
- Spano G, Beneduce L, Perrotta C, Massa S (2005a) Cloning and characterization of the hsp 18.55 gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *Res Microbiol* 156:219–224. doi: 10.1016/j.resmic.2004.09.014
- Spano G, Capozzi V, Vernile A, Massa S (2004a) Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 97:774–782. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02359.x
- Spano G, Capozzi V, Vernile A, Massa S (2004b) Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 97:774–782. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02359.x
- Spano G, Massa S (2006) Environmental Stress Response in Wine Lactic Acid Bacteria: Beyond *Bacillus subtilis*. *Crit Rev Microbiol* 32:77–86. doi: 10.1080/10408410600709800
- Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, Moio L, Beneduce L, Massa S (2005b) A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J Appl Microbiol* 98:855–861.
- Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Alvarez M, Fernández M, Lopez P, de Palencia PF, Corbi A, Trip H, Lolkema JS (2010) Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr* 64:S95–S100. doi: 10.1038/ejcn.2010.218
- Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C (1991) ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol* 173:4254–4262.

- Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0
- Sturino JM, Klaenhammer TR (2004) Antisense RNA Targeting of Primase Interferes with Bacteriophage Replication in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 70:1735–1743. doi: 10.1128/AEM.70.3.1735-1743.2004
- Sugimoto S, Abdullah-Al-Mahin, Sonomoto K (2008) Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. *J Biosci Bioeng* 106:324–336. doi: 10.1263/jbb.106.324
- Sumby KM (2013) Molecular and biochemical characterisation of esterases from *Oenococcus oeni* and their potential for application in wine. Thesis
- Sumby K m., Grbin P r., Jiranek V (2012a) Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J Appl Microbiol* 114:413–422.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem* 121:1–16.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2012b) Validation of the use of multiple internal control genes, and the application of real-time quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni* - Springer. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1039–1047.
- Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V (2014) Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8111–8132.
- Sumby KM, Jiranek V, Grbin PR (2013) Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food Chem* 141:1673–1680.
- Sumby KM, Matthews AH, Grbin PR, Jiranek V (2009) Cloning and Characterization of an Intracellular Esterase from the Wine-Associated Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 75:6729–6735.
- Sun Y, MacRae TH (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci CMLS* 62:2460–2476. doi: 10.1007/s00018-005-5190-4
- Suokko A, Poutanen M, Savijoki K, Kalkkinen N, Varmanen P (2008) ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasserii*. *PROTEOMICS* 8:1029–1041. doi: 10.1002/pmic.200700925
- Suokko A, Savijoki K, Malinen E, Palva A, Varmanen P (2005) Characterization of a Mobile clpL Gene from *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl Environ Microbiol* 71:2061–2069. doi: 10.1128/AEM.71.4.2061-2069.2005

Sutherland M, van Vuuren HJJ, Howe MM (1994) Cloning, sequence and in vitro transcription/translation analysis of a 3.2-kb EcoRI-HindIII fragment of *Leuconostoc oenos* bacteriophage L10. *Gene* 148:125–129. doi: 10.1016/0378-1119(94)90245-3

Swiegers J h., Bartowsky E j., Henschke P a., Pretorius I s. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11:139–173.

T

Taketo A (1988) DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta* 949:318–324.

Tao L, Biswas I (2013a) ClpL Is Required for Folding of CtsR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 195:576–584. doi: 10.1128/JB.01743-12

Tao L, Biswas I (2013b) ClpL is required for folding of CtsR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 195:576–584. doi: 10.1128/JB.01743-12

Tao L, Chattoraj P, Biswas I (2012) CtsR regulation in *mcsAB*-deficient Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 194:1361–1368. doi: 10.1128/JB.06746-11

Teresa Alegre M, Carmen Rodríguez M, Mesas JM (2004) Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett* 241:73–77. doi: 10.1016/j.femsle.2004.10.006

Terrade N, Mira de Orduña R (2009) Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int J Food Microbiol* 133:8–13. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.020

Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vígh 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. doi: 10.1073/pnas.051619498

Török Z, Horváth I, Goloubinoff P, Kovács E, Glatz A, Balogh G, Vígh 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* 94:2192–2197.

To TMH, Grandvalet C, Alexandre H, Tourdot-Maréchal R (2015) Cyclopropane fatty acid synthase from *Oenococcus oeni*: expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and biochemical characterization. *Arch Microbiol* 1–12. doi: 10.1007/s00203-015-1143-y

Tourdot-Maréchal R, Cavin J-F, Drici-Cachon Z, Diviès C (1993) Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: a model to evaluate the kinetic parameters. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:499–505. doi: 10.1007/BF00205040

- Tourdot-Maréchal R, Fortier L-C, 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 Microbiol Lett 178:319–326. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08694.x
- Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Diviès C (2000) Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. Int J Food Microbiol 55:269–273.
- Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Van Melderén L (2006) Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. Res Microbiol 157:701–713. doi: 10.1016/j.resmic.2006.05.004
- Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. Proc Natl Acad Sci 99:13504–13509. doi: 10.1073/pnas.192468399
- Tu LN, Jeong H-Y, Kwon H-Y, Ogunniyi AD, Paton JC, Pyo S-N, Rhee D-K (2007) Modulation of Adherence, Invasion, and Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion during the Early Stages of Infection by *Streptococcus pneumoniae* ClpL. Infect Immun 75:2996–3005. doi: 10.1128/IAI.01716-06
- Turgay K, Hahn Jeanette, Burghoorn J, Budnau D (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. EMBO J 17:6730–6738. doi: 10.1093/emboj/17.22.6730
- Turgay K, Hamoen LW, Venema G, Dubnau D (1997) Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. Genes Dev 11:119–128. doi: 10.1101/gad.11.1.119

U

- Ugliano M, Moio L (2005) Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. J Agric Food Chem 53:10134–10139.

V

- van Bokhorst-van de Veen H, Abee T, Tempelaars M, Bron PA, Kleerebezem M, Marco ML (2011) Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol 77:5247–5256. doi: 10.1128/AEM.00515-11
- van Bokhorst-van de Veen H, Bongers RS, Wels M, Bron PA, Kleerebezem M (2013) Transcriptome signatures of class I and III stress response deregulation in *Lactobacillus plantarum* reveal pleiotropic adaptation. Microb Cell Factories 12:112. doi: 10.1186/1475-2859-12-112

- van der Krol AR, Mol JN, Stuitje AR (1988) Antisense genes in plants: an overview. *Gene* 72:45–50.
- Varcamonti M, Arsenijevic S, Martirani L, Fusco D, Naclerio G, De Felice M (2006) Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock. *Microb Cell Factories* 5:6. doi: 10.1186/1475-2859-5-6
- Varmanen P, Ingmer H, Vogensen FK (2000) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiol Read Engl* 146 (Pt 6):1447–1455.
- Varmanen P, Vogensen FK, Hammer K, Palva A, Ingmer H (2003) *ClpE* from *Lactococcus lactis* promotes repression of *CtsR*-dependent gene expression. *J Bacteriol* 185:5117–5124.
- Ventura M, Canchaya C, Zhang Z, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2007) Molecular Characterization of *hsp20*, Encoding a Small Heat Shock Protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 73:4695–4703. doi: 10.1128/AEM.02496-06
- Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M (1999) *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:447–455.
- Versteeg S, Escher A, Wende A, Wiegert T, Schumann W (2003) Regulation of the *Bacillus subtilis* Heat Shock Gene *htpG* Is under Positive Control. *J Bacteriol* 185:466–474. doi: 10.1128/JB.185.2.466-474.2003
- Vianna E, Ebeler SE (2001) Monitoring Ester Formation in Grape Juice Fermentations Using Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 49:589–595.
- Vigentini I, Grassi S, Sinelli N, Di Egidio V, Picozzi C, Foschino R, Casiraghi E (2014) Near and Mid Infrared Spectroscopy to Detect Malolactic Biotransformation of *Oenococcus oeni* in a Wine-Model. *J Agric Sci Technol* 4:475–486.
- Vishnyakov IE, Levitskii SA, Manuvera VA, Lazarev VN, Ayala JA, Ivanov VA, Snigirevskaya ES, Komissarchik YY, Borchsenius SN (2011) The identification and characterization of *IbpA*, a novel α -crystallin-type heat shock protein from mycoplasma. *Cell Stress Chaperones* 17:171–180. doi: 10.1007/s12192-011-0297-z
- Vuuren HJJV, Dicks LMT (1993) *Leuconostoc oenos*: A Review. *Am J Enol Vitic* 44:99–112.

W

- Wall T, Båth K, Britton RA, Jonsson H, Versalovic J, Roos S (2007) The Early Response to Acid Shock in *Lactobacillus reuteri* Involves the *ClpL* Chaperone and a Putative Cell Wall-Altering Esterase. *Appl Environ Microbiol* 73:3924–3935. doi: 10.1128/AEM.01502-06
- Wang A-Y, Cronan JE (1994) The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an *RpoS*(*KatF*)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol Microbiol* 11:1009–1017. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00379.x

- Wawrzynow A, Banecki B, Zylicz M (1996) The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol* 21:895–899. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.421404.x
- 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 Microbiol Lett* 309:8–15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01999.x
- Westers H, Westers L, Darmon E, van Dijl JM, Quax WJ, Zanen G (2006) The CsxRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *FEBS J* 273:3816–3827. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05389.x
- Wholey W-Y, Jakob U (2012) Hsp33 confers bleach resistance by protecting elongation factor Tu against oxidative degradation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 83:981–991. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07982.x
- Wilkins JC, Homer KA, Beighton D (2001) Altered Protein Expression of *Streptococcus oralis* Cultured at Low pH Revealed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67:3396–3405. doi: 10.1128/AEM.67.8.3396-3405.2001
- Winter J, Linke K, Jatzek A, Jakob U (2005) Severe Oxidative Stress Causes Inactivation of DnaK and Activation of the Redox-Regulated Chaperone Hsp33. *Mol Cell* 17:381–392. doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.027
- Wojtyra UA, Thibault G, Tuite A, Houry WA (2003) The N-terminal Zinc Binding Domain of ClpX Is a Dimerization Domain That Modulates the Chaperone Function. *J Biol Chem* 278:48981–48990. doi: 10.1074/jbc.M307825200.

X

- Xu Z, Sigler PB (1998) GroEL/GroES: Structure and Function of a Two-Stroke Folding Machine. *J Struct Biol* 124:129–141. doi: 10.1006/jsbi.1998.4060

Y

- Yang D, Woese CR (1989) Phylogenetic Structure of the “Leuconostocs”: An Interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. *Syst Appl Microbiol* 12:145–149. doi: 10.1016/S0723-2020(89)80005-0
- Yuan G, Wong SL (1995) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* groE regulatory mutants: evidence for orf39 in the dnaK operon as a repressor gene in regulating the expression of both groE and dnaK. *J Bacteriol* 177:6462–6468.
- Zapparoli G, Fracchetti F, Stefanelli E, Torriani S (2012) Genetic and phenotypic strain heterogeneity within a natural population of *Oenococcus oeni* from Amarone wine. *J Appl Microbiol* 113:1087–1096. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05425.x

Z

- Zé-Zé L, Tenreiro R, Brito L, Santos MA, Paveia H (1998) Physical map of the genome of *Oenococcus oeni* PSU-1 and localization of genetic markers. *Microbiology* 144:1145–1156. doi: 10.1099/00221287-144-5-1145
- Zhang D-S, Lovitt RW (2005) Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *J Appl Microbiol* 99:565–572. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02628.x
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1055–1061. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.092
- Zhang T, Kedzierska-Mieszkowska S, Liu H, Cheng C, Ganta RR, Zolkiewski M (2013) Aggregate-Reactivation Activity of the Molecular Chaperone ClpB from *Ehrlichia chaffeensis*. *PLoS ONE* 8:e62454. doi: 10.1371/journal.pone.0062454
- Zhao X, Wang Y, Shang Q, Li Y, Hao H, Zhang Y, Guo Z, Yang G, Xie Z, Wang R (2015) Collagen-Like Proteins (ClpA, ClpB, ClpC, and ClpD) Are Required for Biofilm Formation and Adhesion to Plant Roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0117414
- Zolkiewski M (2006) A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol Microbiol* 61:1094–1100. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05309.x
- Zotta T, Asterinou K, Rossano R, Ricciardi A, Varcamonti M, Parente E (2009) Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *Int J Food Microbiol* 129:211–220. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.024
- Zúñiga M, Gómez-Escóin CL, González-Candelas F (2011) Evolutionary history of the OmpR/IIIa family of signal transduction two component systems in *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *BMC Evol Biol* 11:34. doi: 10.1186/1471-2148-11-34
- Zúñiga M, Pardo I, Ferrer S (1996a) Transposons Tn916 and Tn925 can transfer from *Enterococcus faecalis* to *Leuconostoc oenos*. *FEMS Microbiol Lett* 135:179–185. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb07986.x
- Zúñiga M, Pardo I, Ferrer S (2003) Conjugative plasmid pIP501 undergoes specific deletions after transfer from *Lactococcus lactis* to *Oenococcus oeni*. *Arch Microbiol* 180:367–373. doi: 10.1007/s00203-003-0599-3
- Zúñiga M, Pardo I, Ferrer S (1996b) Nucleotide Sequence of Plasmid p4028, a Cryptic Plasmid from *Leuconostoc oenos*. *Plasmid* 36:67–74. doi: 10.1006/plas.1996.0034

Annexe

Figure annexe 1 : Alignement des séquences peptidiques des ClpATPases de classe I identifiés dans le génome des bactéries de la famille des *Leuconostocaceae* contre les séquences peptidiques de ClpE et/ou de ClpL de *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363 (AAD01782.1), *L. lactis* subsp *lactis* CNRZ270 (CAA44207.1), *L. plantarum* WCFSI (YP_004889161.1; YP_004891060.1), *S. aureus* ST228 (CCJ23596.1), *S. pneumoniae* D39 (ABJ54606.1; AFC91878.1), *B. subtilis* 168 (NP_389253.1), *S. mutans* UA159 (NP_720997.1), *S. pyogenes* A20 (AFV38356.1), *E. faecalis* V583 (NP_814457.1), *E. faecium* E980 (EFF38193.1) et *L. rhamonossus* E97-800(AAW22449.1; AJ749818), *L. casei* BL23 (CAQ67279.1). L'analyse des banques de données a révélé la présence de gènes codant des Clp-ATPases de classe I de la famille des ClpL chez *L. citreum* KM20, *L. kimchii* IMSNU 11154, *L. mesenteroides* subsp *cremoris* ATCC 19254, *L. mesenteroides* subsp *mresenteroides* ATCC 8293 et *O. oeni* ATCC BAA-1163 (CAE54288.1; EAV39924.1). Méthode des plus proches voisins utilisant le modèle de Poisson. L'arbre est construit par mesure des distances moyennes calculées à partir du % d'identité des séquences peptidiques issues de l'alignement multiple présenté en Annexe 1. L'arbre est enraciné par ajout de la séquence peptidique de ClpB de *S. mutans* UA159 (NP_721783.1) Mise en évidence des domaines conservés : deux domaines NBD (AAA-1 : **bleu clair** et AAA-2 en **vert foncé**), le motif [V/M-G-F] de fixation à la protéine ClpP apparaît en **vert** et le motif en doigt de zinc apparaît en **rose**, le domaine D2-small mise en évidence chez *S. mutans* pour interagir avec CtsR apparaît en **rouge**, le motif conservé de 8 acides aminés mit en évidence chez *L. lactis* et *S. pneumoniae* est surligné en **jaune**.

O. oeni est responsable de la fermentation malolactique des vins. Elle doit en permanence s'adapter aux fluctuations physico-chimiques de son environnement. La production de protéines Hsp constitue un mécanisme majeur d'adaptation de la bactérie à son environnement. Chez *O. oeni*, la protéine CtsR est l'unique régulateur identifié à ce jour des gènes *hsp*. Ce manuscrit aborde la caractérisation des mécanismes de régulation de la réponse au stress chez *O. oeni*. Une partie de ce travail a consisté à développer un nouvel outil d'expression de gènes chez *O. oeni*. Cet outil a permis l'étude de la fonction *in vivo* du gène *hsp18* par une technique de modulation de l'expression de gènes par synthèse d'ARN antisens (ARNas). La production d'ARNas ciblant l'ARN messager du gène *hsp18* entraîne une diminution du taux protéique de Lo18 et induit une perte de cultivabilité en conditions de stress. Ces résultats montrent, pour la 1ère fois *in vivo*, l'implication de Lo18 dans la thermotolérance et l'acidotolérance de *O. oeni*. Cette même approche appliquée au gène *ctsR* a induit une perte de cultivabilité en conditions de stress confirmant le rôle clef du locus *ctsR* dans la réponse au stress de *O. oeni*. Les mécanismes de régulation de l'activité de CtsR ont été appréhendés par complémentation d'un mutant *ctsR* déficient de *B. subtilis* via l'expression de *ctsR* de *O. oeni*. Des tests de thermoinduction mettent en évidence la thermosensibilité du CtsR de *O. oeni* dont l'activité est levée à une température inférieure à 33°C. Le pSIPSYN est un outil prometteur valorisé au cours de ce travail par une étude évaluant l'impact de deux estérases de *O. oeni*, EstA2 et EstA7 sur le profil aromatique du vin.

Mot-clefs : *Oenococcus oeni*, réponse au stress, régulateur transcriptionnel CtsR, sHsp Lo18, ARN antisens et estérases EstA2 & EstA7.

Abstract

O. oeni is responsible for wine malolactic fermentation. As any organism, *O. oeni* tries to adapt its physiology to environmental fluctuations by producing Hsp proteins encoded by the *hsp* genes. In *O. oeni*, CtsR is currently the only regulator of *hsp* genes. As an alternative to the lack of genetic tool, with the goal of understanding the mechanisms of *O. oeni* stress response, we developed a new expression vector, the pSIPSYN, to produce antisense RNA targeting of *hsp18* mRNA. The synthesis of *hsp18* asRNA leads to the decrease in the protein level of Lo18 and induced a loss of cultivability after heat or acid shock showing for the first time *in vivo* involvement of Lo18 in thermotolerance and acidotolerance in *O. oeni*. The *O. oeni* ability of the membrane fluidity restoration of after ethanol stress was strongly affected in the presence of asRNA of *hsp18* gene. Then, the *ctsR* function in *O. oeni* was investigated with this new genetic tool. Inhibition of the *ctsR* expression by asRNA approach induced a loss of cultivability after heat or acid shock confirming the key role of *ctsR* locus in the *O. oeni* stress response. *B. subtilis* was used to characterize the regulation of CtsR activity. The *ctsR* gene of *O. oeni* was expressed to complement a *B. subtilis* *ctsR*-deficient strain and restore the wild-type phenotype. Thermoinduction tests performed to understand the thermosensibility of CtsR showed that *O. oeni* CtsR is a specific thermosensor inactivated at a temperature threshold below 33°C. The pSIPSYN is a promising tool valorized in this work through an oenological study by evaluating of the impact of *O. oeni* two esterases, and EstA2 EstA7 on wine ester profile.

Key-words: *Oenococcus oeni*, stress response, transcriptionnal repressor CtsR, sHsp Lo18, antisense RNA and esterases EstA2 & EstA7.