



Étude de la tolérance à l'acidité et aux polyphénols chez *Oenococcus oeni*, de la caractérisation des effets à l'identification des mécanismes de réponse aux stress

Marion Breniaux

► To cite this version:

Marion Breniaux. Étude de la tolérance à l'acidité et aux polyphénols chez *Oenococcus oeni*, de la caractérisation des effets à l'identification des mécanismes de réponse aux stress. Alimentation et Nutrition. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0735 . tel-01785228

HAL Id: tel-01785228

<https://theses.hal.science/tel-01785228>

Submitted on 4 May 2018

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : OENOLOGIE

Par Marion BRENIAUX

**Étude de la tolérance à l'acidité et aux polyphénols chez
Oenococcus oeni, de la caractérisation des effets à
l'identification des mécanismes de réponse aux stress**

Sous la direction de : Patrick LUCAS

Soutenue le 17 novembre 2017

Membres du jury :

M. TEISSEDRE, Pierre-Louis
M. BORDONS, Albert
M. SAUCIER, Cédric
Mme. REGUANT MIRANDA, Cristina
Mme. KRIEGER, Sibylle
M. LUCAS, Patrick

Université de Bordeaux
Universitat Rovira i Virgili
Université de Montpellier
Universitat Rovira i Virgili
Société Lallemand
Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Étude de la tolérance à l'acidité et aux polyphénols chez *Oenococcus oeni*, de la caractérisation des effets à l'identification des mécanismes de réponse aux stress

Oenococcus oeni est la principale bactérie lactique du vin. L'espèce comprend de nombreuses souches plus ou moins bien adaptées au vin et qui forment différents groupes génétiques. Récemment, deux groupes de souches ont été identifiés dans les vins rouges (VR) et vins blancs (VB) de Bourgogne. Il est probable que les bactéries se sont adaptées à l'un ou l'autre de ces vins en raison de leurs différences physico-chimiques et de composition. Néanmoins, d'autres souches peuvent s'y développer. Ce sont par exemple des levains commerciaux, qui ont une bonne tolérance aux stress du vin. L'objectif de cette étude était d'analyser l'adaptation des souches d'*O. oeni* au vin et en particulier aux polyphénols. Dans un premier chapitre, des souches des groupes VR et VB ont été étudiées. Leurs phénotypes ont été comparés dans des moûts et des vins à différents pH et en présence de polyphénols. Les résultats ont permis de mieux comprendre leur adaptation au vin blanc ou rouge. Dans les deuxième et troisième chapitres, la tolérance à l'acidité et aux polyphénols de souches commerciales a été étudiée. Leur résistance au vin et leurs capacités fermentaires ont été analysées, les cellules ont été observées en microscopie électronique et les mécanismes de résistance à l'acidité et aux polyphénols ont été recherchés par protéomique quantitative. Un protocole de purification des protéines spécifique pour les essais en présence de polyphénols a été mis au point. Les résultats montrent des voies métaboliques et enzymes qui contribuent à l'adaptation des souches au vin. Ils permettent également l'exploration de nouvelles pistes pour la sélection des souches industrielles.

Mots clés : *Oenococcus oeni*, acidité, polyphénols, stress, protéomique

Study of acidity and polyphenolic tolerance of *Oenococcus oeni*, from characterization of effects to identification of stress response mechanisms

Oenococcus oeni is the main lactic acid bacteria species in wine. The species comprises many strains, which are more or less well adapted to wine and form different genetic groups. Recently, two groups of strains have been identified from Burgundy's red (VR) and white (VB) wines. It is likely that the bacteria have adapted to one or the other of these wines because of their different physico-chemical properties and compositions. Nevertheless, other strains can also develop in these wines. They are for example commercial starters, which are well resistant to wine stressors. The objective of this study was to analyze the adaptation of *O. oeni* strains to wine and particularly to phenolic compounds. In the first chapter, strains of groups VR and VB were studied. Their phenotypes were compared in grape musts and in wines at different pHs and in the presence of phenolic compounds. The results provide insights on their adaptation to red or white wine. In the second and third chapters, the tolerance to acidity and phenolic compounds of commercial strains has been studied. Their survival in wine and their fermentative capacities were analyzed, the cells were observed by electron microscopy and the mechanisms of resistance to acidity and phenolic compounds were investigated by quantitative proteomics. A specific protein purification protocol has been developed for trials performed in the presence of polyphenols. The results show metabolic pathways and enzymes that contribute to the adaptation of strains to wine. They also open new tracks for the selection of industrial strains.

Keywords : *Oenococcus oeni*, acidity, polyphenols, stress, proteomic

Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury, Mr Pierre-Louis Teissedre, Mr Albert Bordons, Mr Cédric Saucier, Mme Cristina Reguant-Miranda et Mme Sibylle Krieger, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et fait le déplacement jusqu'à Bordeaux.

Je souhaite ensuite remercier mon directeur de thèse, Patrick Lucas, de m'avoir proposé ce sujet de thèse qui m'a permis de revenir au monde de l'œnologie. Merci pour la confiance et la liberté de travail que tu m'as accordées pendant toutes ses années.

Je tiens également à remercier la société Lallemand dont Magali Bou-Deleris et Sibylle Kriger pour le soutien financier, mais aussi pour tous les conseils et remarques pertinentes sur le projet. Je suis très heureuse de notre collaboration durant cette thèse. De plus, j'aimerais remercier les membres de l'équipe R&D de chez Lallemand pour leur gentillesse et leur accueil lors de nos rencontres.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec différentes équipes et personnes comme :

L'équipe de microbiologie de Tarragone : Je voudrais vous adresser un grand merci pour votre accueil si chaleureux, votre aide et vos conseils, notamment Cristina Reguant-Miranda, Albert Bordons, Isa Araque et Judit Franques. Merci, Judit de m'avoir ouvert la porte de ta famille, mais aussi de ton cercle d'amis. Tu m'as fait découvrir votre si belle région, vos nombreuses traditions, votre langue et cela restera un très bon souvenir. J'espère de tout mon cœur que tu pourras achever le travail que tu as entrepris.

L'équipe polyphénols de l'ISVV : Merci à Michael Jourdes, Kleopatra Chira et Reyes Gonzalez Centeno de m'avoir conseillé et aidé avec mes extractions/fractionnements. Merci pour vos encouragements lors de mes longues heures devant le rotavapor.

L'équipe de microbiologie de l'ISVV : Merci à Cécile Miot-Sertier, Olivier Claisse et Lucie Dutilh pour votre aide technique durant cette thèse. Toutes ces dilutions et dénombrements ne se seraient pas fait aussi rapidement si tu n'avais pas été là, Lucie. Je souhaite aussi remercier Mariette El Khoury pour m'avoir formé sur le sujet de thèse à mon arrivée, mais aussi pour tous les conseils et le soutien que tu as pu m'apporter. Je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe de microbiologie Claire Le Henaff, Isabelle Masneuf-Pomarede, Marina Belly, Marguerite Dols,

Patricia Ballestra, Julie Maupeu, Amélie Vallet-Courbin, Philippe Marullo, Warren Albertin, Margaux Bernard, Hugo Campbell-Sills et Aline Lonvaud pour toutes les discussions, conseils, aides scientifiques allant de la bio-informatique à la microscopie en passant par la protéomique.

L'équipe de Bordeaux Imaging center : Merci à l'ensemble du BIC pour son accueil chaleureux. Merci, Melina, pour ton aide durant cette collaboration. Je suis très heureuse d'avoir passé de longue heure devant le microscope à chercher des petites bêtes avec toi, à parler de tout et de rien, d'avoir pleuré et ri. C'est une très belle rencontre que la thèse m'aura apportée. Le risotto à la truite et aux écorces de citron restera toujours associé à toi.

L'équipe de la plateforme protéomique du CHU de Québec : Merci Benjamin Némé pour ton implication dans le projet et tes nombreuses mises au point.

L'équipe du génie des procédés : Comme il est coutume de vous remercier, je le fais... Non en fait je voulais vraiment vous remercier pour votre accueil et vos conseils lorsque je venais stocker, filtrer, doser ou nanozetasizer. Merci à Rémy Ghidossi, Soizic Lacampagne et l'ensemble des membres de l'équipe.

Enfin pour finir, je voudrais remercier Nathalie Alvarez et Caroline Baz pour le temps que vous m'avez accordé en salle de TP lors de mes analyses, ainsi que ma stagiaire Laura.

Un grand merci à Virginie Moine et Stéphanie Marchand. J'ai durant mon année de licence découvert le monde du vin et de la recherche. J'ai pu voir la passion qui vous animait et cela m'a donné l'envie de continuer dans cette voie. J'ai beaucoup appris humainement et scientifiquement avec vous et je pense que vous n'êtes pas pour rien dans la réalisation de cette thèse.

Ces années n'auraient pas été les mêmes sans tous mes copains de labo, de bureau et d'apéro : Maroula, Mariette, Fety, Yulie, Émilien, Cécile, Alice, Marta, Marine, Mathilda, Nico et Maxime. Un énorme merci à ma merveilleuse copine Margaux pour toutes nos discussions, tes encouragements et tes coups de pied aux fesses pendant cette thèse. On a partagé tellement de belles choses qu'il est impossible d'en citer qu'une.

Je remercie aussi Sophie, Amélie et Céline pour tous les conseils, les discussions scientifiques et écologiques, mais aussi pour ce trajet aller-retour Bordeaux/Beaune au rendez-vous matinal.

Je voulais donc tous vous dire merci pour tous ces moments de bonne humeur et de fou rire : les fous rire sur le film « les visiteurs », le spectacle de l'ISVV, les éternels débats de repas qui finisse toujours par retomber sur le même sujet (cf. Fety...), les cafés sur le toit à observer « le vert tendre du printemps », les chansons qui restent dans la tête, les paris en ligne et les matchs de foot...

Un grand merci à Will et Cécile pour votre amitié. Je vous ai rencontré lorsque j'étais encore un bébé stagiaire et je suis heureuse que l'on soit devenus amis et qu'on partage toujours de si bons moments autour d'un hamburger.

Je souhaite aussi remercier mon G4 d'amour : Eudoxie, Clémentine et Morgane. En regardant Tanguy tant de fois quand on était jeune, je ne pensais pas que moi aussi je ferais une p* de thèse et qu'il y aurait si peu de personnes dans le monde à comprendre de quoi je parle.

Merci à tous mes amis Bourguignon notamment mon meilleur ami Anthony qui a suivi ma longue scolarité.

Un grand merci à Yannou, mon coloc Nantais/cuistot de l'enfer pour son aide durant mon concours de l'école doctorale, ses conseils avisés de doctorant et de chercheur, ses encouragements et son amitié.

Merci à mes copains Bordelais : Marie, Sarah, Camille, Mika, Jeremy, Rico, Justine, Poilou, Axelle, Dorian, Florian, Manue, Idris, Maxime, Adrien, Tania, Clemence, Nico, Aurel, Julie...

J'aimerais aussi remercier mes fabuleux parents, de m'avoir encouragé dans mes études et ses nombreux rebondissements, de m'avoir soutenu moralement et financièrement, ainsi que pour tous les rapports de stage et mémoires que vous m'avez corrigés. Je suis tellement chanceuse de vous avoir. Merci également à toute ma famille et à ma belle famille pour votre soutien.

Enfin, je souhaite remercier mon chéri Benoit qui m'a vraiment supportée pendant toutes mes nombreuses révisions lors de mes différentes formations et durant mes années de thèse. Tu as toujours été là pour me motiver et que je donne le meilleur de moi-même, même si je pense que tu en avais marre de mes bactéries, mes polyphénols et ma protéomique...

Et pour finir merci à mon bébé pour tout le bonheur et l'amour que tu me donnes.

Sommaire

Introduction.....	1
Étude bibliographique.....	5
I. Le vin et ses fermentations	6
I.1. Principe de l'élaboration du vin	6
I.2. La fermentation alcoolique.....	7
I.3. La fermentation malolactique.....	8
I.3.1. Rôle physiologique	8
I.3.2. Intérêt œnologique	11
II. La bactérie lactique : <i>Oenococcus oeni</i>	13
II.1. Les bactéries lactiques	13
II.2. La bactérie lactique du vin, <i>Oenococcus oeni</i>	14
II.3. Organisation des cellules d' <i>O. oeni</i>	15
II.4. Le génome d' <i>O. oeni</i>	18
II.5. Biogéographie et diversité intraspécifique de l'espèce.....	18
II.6. Recherche de corrélations entre le génome et les phénotypes des souches	20
III. Les facteurs de stress du vin et leur impact sur les bactéries lactiques.....	21
III.1. Les différents stress du vin	21
III.1.1. Le pH.....	23
III.1.2. Le degré d'alcool.....	23
III.1.3. La température.....	24
III.1.4. Le dioxyde de soufre	25
III.1.5. Les composés phénoliques	25
III.2. Les polyphénols du vin et leur action sur les microorganismes	26
III.2.1. Les différents polyphénols du vin	26
III.2.2. L'action antimicrobienne des polyphénols.....	29
III.3. Mécanismes de résistance aux stress	33
III.3.1. Activation de l'ATPase membranaire	33
III.3.2. Activation des mécanismes en lien avec le système redox	34
III.3.3. Maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire	38
III.3.4. Synthèse des protéines de stress	41
Matériels et méthodes	44
I. Matériels biologiques	45
II. Vins utilisés lors des essais	46
III. Conditions de culture	46
IV. Mesure de la croissance bactérienne	47
IV.1. Dénombrement des colonies sur milieu solide	47
IV.2. Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence	48
V. Fermentations malolactiques.....	49
VI. Tests phénotypiques.....	50
VI.1. Matrices testées.....	50
VI.2. Conditions de stress	50
VII. Observations microscopiques	51
VII.1. Préparation des cellules	51
VII.2. Fixation des cellules	52
VII.3. Imprégnation et inclusion	52
VII.4. Coupes et observation.....	52
VII.5. Contraste de Thiery	53
VII.6. Coloration négative.....	54
VII.7. Analyses d'images.....	54

<i>VIII. Analyses polyphénoliques</i>	55
VIII.1. Degré de polymérisation moyen	55
VIII.1.1. Préparation des échantillons	56
VIII.1.2. Réaction de phloroglucinolyse	57
VIII.1.3. Mesure par chromatographie et calcul du Dpm	57
VIII.2. Identification et quantification des monomères et des oligomères du vin	58
VIII.3. Dosage des anthocyanes	59
VIII.4. Dosages des tannins totaux	59
VIII.5. Extraction des polyphénols totaux du vin	60
VIII.6. Fractionnement d'extrait polyphénolique	60
VIII.6.1. Extraction liquide/liquide	60
VIII.6.2. Fractionnement par précipitation au chloroforme	61
<i>IX. Analyses générales du vin</i>	62
<i>X. Étude transcriptomique</i>	63
X.1. Extraction des ARN totaux	63
X.1.1. Méthode d'extraction des ARN développée par (Dimopoulou, 2013)	63
X.1.2. Méthode d'extraction des ARN par Kit Roche®	64
X.2. Contrôle qualité ARN	65
X.2.1. Électrophorèse à champ constant sur gel d'agarose	65
X.2.2. Dosage de l'ARN	66
X.2.3. Mesure de l'intégrité de l'ARN	66
<i>XI. Étude protéomique</i>	67
XI.1. Préparation des échantillons	67
XI.2. Extraction protéique	69
XI.3. Dosage protéique par la méthode colorimétrique de Bradford	70
XI.4. Analyse protéomique quantitative type iTRAQ	71
XI.4.1. Principe du marquage iTRAQ	71
XI.4.2. Marquage des échantillons	72
XI.4.3. Spectrométrie de masse	72
XI.4.4. Analyse bio-informatiques et traitement des données	73
XI.5. Analyse protéomique qualitative	74
XI.5.1. Préparation des échantillons	74
XI.5.2. Analyse par spectrométrie de masse	74
XI.5.3. Analyses bio-informatiques et traitement de données	75
XI.6. Analyse protéomique quantitative type label Free	75
XI.6.1. Principe de la quantification label-free	75
XI.6.2. Analyse en spectrométrie de masse	75
XI.6.3. Analyses bio-informatiques et traitement des données	76
<i>XII. Analyses Bioinformatique</i>	77
XII.1. Analyses statistiques	77
XII.2. Analyses génomiques	78
Résultats et discussion	79
 Chapitre 1 : Étude de la résistance aux polyphénols et à l'acidité de souches d'<i>O. oeni</i> spécifiques de vins blancs ou rouges	80
I. Objectifs de l'étude et choix des souches	80
II. Comparaison des phénotypes dans le moût	81
II.1. Cinétique de croissance	81
II.2. Influence de l'acidité du moût	84
II.3. Influence des polyphénols dans le moût	86
II.3.1. Extraits de polyphénols totaux de vins	87
II.3.2. Extraits de polyphénols commerciaux	88
III. Comparaison des phénotypes dans le vin	90
III.1. Influence du pH du vin	91
III.2. Influence des polyphénols dans le vin	94

IV. Influence de différentes fractions de l'extrait T3 sur la survie	98
V. Observation en microscopie électronique des cellules exposées aux polyphénols	101
V.1. Essai d'observation par coloration négative	101
V.2. Observations au MET après exposition des cellules aux polyphénols	102
V.2.1. Contrôles de la survie des cellules dans les conditions de tests.....	102
V.2.2. Observations après exposition dans un vin blanc supplémenté ou non en polyphénols.....	103
V.2.3. Observation après exposition dans un vin rouge supplémenté ou non en polyphénols.....	105
V.3. Observations après marquage spécifique des polysaccharides	107
V.4. Mesure de la variation de l'épaisseur de la paroi	111
VI. Comparaison des répertoires de gènes de production de polysaccharides des deux groupes de souches	113
VII. Discussion.....	116
Chapitre 2 : Étude de la tolérance à l'acidité de souches d'<i>O. oeni</i> industrielles	120
I. Objectifs et choix des souches testées	120
II. Évaluation de la tolérance à l'acidité de cinq souches commerciales	122
II.1. Essais réalisés dans un vin blanc	122
II.2. Essais réalisés dans un vin rouge	124
II.3. Capacités de transformation de l'acide malique en fonction du pH	126
III. Analyse protéomique de la résistance à l'acidité.....	128
III.1. Essai préliminaire réalisé dans milieu « jus de raisin »	128
III.2. Essai de protéomique quantitative pour l'identification des mécanismes d'adaptation à l'acidité du vin	134
IV. Discussion.....	140
Chapitre 3 : Étude de la tolérance aux polyphénols de souches d'<i>O. oeni</i> industrielles	146
I. Objectif et choix des souches testées	146
II. Évaluation de la tolérance aux polyphénols de souches commerciales.....	146
II.1. Capacités fermentaires en présence de polyphénols de l'extrait T1	146
II.2. Évaluation de la tolérance de souches commerciales aux polyphénols de l'extrait T3	148
III. Analyse de l'effet des polyphénols sur la souche LAB6 par observation en microscopie électronique.....	153
III.1. Observations au MET après exposition des cellules aux polyphénols	153
III.2. Observations après marquage spécifique des polysaccharides	155
IV. Analyse protéomique de la résistance aux polyphénols.....	157
IV.1. Mise au point d'une méthode d'analyse	157
IV.2. Analyse du protéome de la souche LAB6 en présence de polyphénols	158
IV.2.1. Production des protéomes de LAB6 avec ou sans ajout d'extrait T3.....	158
IV.2.2. Analyse des voies métaboliques de LAB6 affectées par la présence d'extrait T3	160
V. Discussion.....	167
Conclusion générale	173
Références bibliographiques	177
Communications scientifiques.....	195
Annexes	197

Abréviations

ABC : Bicarbonate d'ammonium

ACN : Acétonitrile

ADI : Arginine Deiminase Pathway

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AF : Acide formique

ARN ou RNA : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ATP : Adénosine triphosphate

BDMA : Benzyldiméthylamine

BET : Bromure d'éthidium

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPS : Polysaccharides capsulaires

CRB OENO : Centre de ressources biologiques œnologiques

CTAB : Cetyltriméthylammonium bromide

DEPC : Diéthylpyrocarbonate

DDSA : Dodécényl succinique anhydrique

DOC : Désoxycholate de sodium

DPm : Degré de polymérisation moyen

DRO : Dérivés réactifs à l'oxygène

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EtOH : Éthanol

EP : Étude protéomique

EPS : Exopolysaccharides

ESI : Electronspray ionisation

FA : Fermentation alcoolique

FDR : False Rate Discovery

FML : Fermentation malolactique

GAE : Équivalent acide gallique

h : Heures

HCD : Higher energy Collision Dissociation

HSP : Heat shock proteins

iTRAQ : Quantification relative et absolue par marquage isotopique

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

MeOH : Méthanol

MET : Microscopie électronique à transmission

min : Minutes

MLST : Multilocus sequence typing

MLVA : Multiple Loci VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) Analysis

MMTS : Méthyle methanethiosulfate

MNA : Méthyle-Nadic anhydrique

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

NAG : N-acétyl-glucosamine

NanoLC : Nano chromatographie liquide capillaire

NAM : N-acétyl-muramique

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PTS : Phosphotransférase

PVP : Polyvinylpyrrolidone

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

qsp : Quantité suffisante pour

RAPD-PCR : l'ADN polymorphe par réaction en chaîne par polymérase

RAST : Rapid Annotation using Subsystem Technology

RIN : RNA integrity number

RNAseq : RNA sequencing

RP : Phase inverse

s : Secondes

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate
polyacrylamide gel electrophoresis

TCEP : Tris-(2-carboxyethyl)phosphine

TEAB : Triéthylammonium bicarbonate

TFA : Trifluoroacétique

UFC : Unité formant colonie

UPLC : Ultra Performance Liquid
Chromatography

VB : Souches appartenant au groupe vin
blanc de Bourgogne

VR : Souches appartenant au groupe vin
rouge de Bourgogne

v/v : Volume/volume

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénomique de souches d' <i>O. oeni</i> (Campbell-Sills, 2015).....	3
Figure 2: Principes généraux de la fabrication du vin blanc et du vin rouge de Bourgogne.....	7
Figure 3: La fermentation malolactique : équation de la réaction et stéréochimie.....	8
Figure 4: Transport de l'acide malique chez <i>O. oeni</i> et rôle de la FML pour le maintien du pH interne.....	9
Figure 5: Organisation de l'opéron malolactique chez <i>O. oeni</i> (Bartowsky, 2005).	10
Figure 6 : Force proton motrice et fermentation malolactique (Bouix et al. 2015).....	11
Figure 7 : Structure chimique du diacétyle.	12
Figure 8: Arbre phylogénétique des familles de l'ordre des Lactobacillales basé sur les séquences des gènes d'ARNr 16S (Mozzi et al., 2015).....	13
Figure 9: Résumé de l'histoire des bactéries dans le vin et de la FML. Adapté de (Bartowsky & Borneman, 2011).	15
Figure 10: Schéma de la structure du peptidoglycane chez <i>O. oeni</i>	16
Figure 11: Comparaison d'une souche d' <i>O. oeni</i> encapsulée (A) et non encapsulée (B) d'après (Dimopoulou et al. 2016).	17
Figure 12: Exemples de bactéries produisant des EPS observés au MET (Whitfield, 1988).	17
Figure 13: Structure chimique des acides-phénols.	26
Figure 14: Structure chimique du trans-picéide.	27
Figure 15: Structure chimique de base des composés flavonoïdes.....	27
Figure 16: structure chimique des anthocyanidines du raisin.....	28
Figure 17: Structures chimiques des flavan -3-ols.	28
Figure 18: Mécanismes de la réaction antioxydante impliquant la thiorédoxine (Trx) et thiorédoxine réductase (TrxR).....	35
Figure 19: Mécanismes de la réaction antioxydante impliquant la glutathione peroxydase (Gpo) et la glutathione réductase (GshR).	36
Figure 20: Mécanismes d'oxydoréduction impliquant le glutathion chez certaines souches d' <i>O. oeni</i> (Margalef-Català et al. 2017).....	37
Figure 21: Modèle de l'activité de la protéine Lo18 chez <i>O. oeni</i> en réponse à la présence d'éthanol (Maitre et al., 2014).	40
Figure 22 : Dénombrement « en goutte » de deux souches de Bourgogne.	48
Figure 23 : Schéma du mode d'action de la réaction de Thiery sur la cellulose.....	53
Figure 24 : Schéma de la modélisation d'une cellule bactérienne sous forme de cercle.....	55
Figure 25 : Schéma du principe de la réaction de phloroglucinolyse (Chira, 2009).	56

Figure 26 : Mode opératoire extraction liquide/liquide.....	61
Figure 27 : Mode opératoire de la précipitation d'une fraction polyphénolique aqueuse au chloroforme adapté de (Saucier et al., 2001).....	62
Figure 28 : Principe de l'extraction ARN (High pure RNA isolation kit, ROCHE®).....	65
Figure 29 : Préparation des puces pour électrophorèse capillaire.....	67
Figure 30 : Principe de l'analyse protéomique iTRAQ (Ross et al. 2004).....	71
Figure 31 : Structure du réactif iTRAQ (Ross et al. 2004).....	71
Figure 32 : Croissances des souches des groupes VB et VR dans le moût et à différents pH.....	83
Figure 33 : Croissances moyennes des souches de chaque groupe.....	84
Figure 34 : Survie des souches des groupes VB et VR dans le moût en fonction du pH.....	86
Figure 35 : Effet de différents extraits polyphénoliques de vins sur la survie de souche du groupe VB et VR.....	88
Figure 36 : Survie des souches des groupes VB et VR en fonction du type et de la quantité de polyphénols au cours du temps dans un moût.....	90
Figure 37 : Survie des souches des groupes VB et VR dans un vin blanc en fonction du pH.....	92
Figure 38 : Survie des souches des groupes VB et VR dans un vin rouge en fonction du pH.....	93
Figure 39 : Effet de l'extrait de polyphénols T3 sur les souches des groupes VB et VR dans un vin blanc.....	95
Figure 40 : Effet de l'extrait de polyphénols T3 sur les souches des groupes VB et VR dans un vin rouge.....	97
Figure 41 : Effet de deux fractions issues de T3 sur la survie de souche du groupe VB et VR.....	98
Figure 42 : Effet de différentes fractions de la fraction aqueuse de l'extrait T3 sur la survie de souches VB.....	100
Figure 43 : Observations de cellules au MET après coloration négative.....	102
Figure 44 : Survie des souches 14 196 et 14 213 des différentes conditions observées au MET.....	103
Figure 45 : Observation de la souche 14 196 (VB) après exposition dans un vin blanc en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.....	104
Figure 46 : Observation de la souche 14 213 (VR) après exposition dans un vin blanc en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.....	105
Figure 47 : Observation de la souche 14 196 (VB) après exposition dans un vin rouge en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.....	106
Figure 48 : Observation de la souche 14 213 (VR) après exposition dans un vin rouge en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.....	107
Figure 49 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 196 (VB) dans un vin blanc et en présence d'extraits polyphénoliques.....	108

<i>Figure 50 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 213 (VR) dans un vin blanc et en présence d'extraits polyphénoliques.....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 51 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 196 (VB) dans un vin rouge et en présence d'extraits polyphénoliques.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 52 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 213 (VB) dans un vin rouge et en présence d'extraits polyphénoliques.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 53 : Mesure de la taille de la paroi modélisée dans différentes conditions de stress polyphénolique.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 54 : Distribution des gènes de synthèse d'EPS chez les deux groupes phylogénétiques VB et VR.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 55 : Comparaison des opérons EPS1 et EPS2 des souches des groupes VB et VR.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 56 : Influence du pH sur la survie des souches commerciales en fonction du pH dans un vin blanc.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 57 : Influence du pH sur la survie des souches commerciales dans un vin rouge.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 58 : Dégradation de l'acide L-malique par les souches commerciales en fonction du pH et du type de vin.....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 59 : Répartition des protéines identifiées lors de l'étude protéomique n° 1 iTRAQ dans un moût en fonction du pH.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 60 : Distribution des protéines identifiées dans les voies métaboliques de la base de données KEGG.....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 61 : Distribution dans des voies métaboliques de KEGG des protéines de la souche LAL01 sur- ou sous-exprimées à pH 3,3 versus pH 4.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 62 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress acide.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 63 : Représentation schématique des principaux mécanismes mis en place par la souche d'O. oeni LAL01 lors de l'adaptation à long terme dans un vin blanc acide.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 64 : Influence de la concentration en extrait polyphénolique T1 sur les cinétiques de fermentation de différentes souches commerciales.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 65 : Évolution des populations de souches commerciales produites sous forme liquide et lyophilisée et inoculées dans un vin blanc supplémenté en extrait T3.....</i>	<i>150</i>
<i>Figure 66 : Évolution des populations de souches commerciales produites sous forme liquide et lyophilisée et inoculées dans un vin rouge supplémenté en extrait T3.....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 67 : Morphologie de la souche commerciale LAB6 en version liquide ou lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin blanc.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 68 : Morphologie de la souche LAB6 en version liquide ou lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin rouge.....</i>	<i>155</i>

<i>Figure 69 : Recherche de polysaccharides chez la souche LAB6 lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin rouge.....</i>	<i>156</i>
<i>Figure 70 : Répartition des protéines identifiées chez la souche 14215 en présence de 0 ou 5 g/L d'extrait T1.</i>	<i>158</i>
<i>Figure 71 : Nombres de protéines identifiées par protéomique quantitative après incubation de la souche LAB6 dans un vin rouge en présence ou absence d'extrait T3.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 72 : Modification de l'expression des protéines de la souche LAB6 en présence d'extrait T3.</i>	<i>160</i>
<i>Figure 73 : Distribution des protéines de la souche LAB6 sur- ou sous-exprimées lors de l'ajout de 1 g/L d'extrait T3.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 74 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress en présence de 1 g/L d'extrait T3.</i>	<i>164</i>
<i>Figure 75 : Distribution des protéines de la souche LAB6 sur- ou sous-exprimées lors de l'ajout de 2,5 g/L d'extrait T3.</i>	<i>165</i>
<i>Figure 76 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress en présence de 2,5 g/L d'extrait T3.....</i>	<i>166</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Principaux inhibiteurs du vin pour O. oeni et leurs mécanismes d'actions.</i>	22
<i>Tableau 2: Effet des polyphénols sur la viabilité et la FML des bactéries lactiques du vin.</i>	31
<i>Tableau 3 : Liste des souches utilisées durant cette étude.</i>	45
<i>Tableau 4 : Paramètres analytiques des vins utilisés.</i>	46
<i>Tableau 5 : Composition des extraits polyphénoliques.</i>	51
<i>Tableau 6 : Gradient d'élution pour la mesure du Dpm.</i>	57
<i>Tableau 7 : Gradient d'élution pour le dosage des monomères et des oligomères du vin par CLHP-Fluo.</i>	58
<i>Tableau 8 : Détail des différentes expérimentations de protéomique.</i>	68
<i>Tableau 9 : Origines des souches des groupes VB et VR.</i>	81
<i>Tableau 10 : Caractéristiques des souches commerciales utilisées.</i>	121
<i>Tableau 11 : Protéines identifiées chez la souche 14 217 par comparaison des conditions stressantes et non stressantes.</i>	129
<i>Tableau 12 : Données de quantification des 533 protéines de la souche LAL01 dans un vin blanc à pH 3,3/pH 4.</i>	135
<i>Tableau 13 : Liste des protéines de la souche LAL01 sur- ou sous-exprimées à pH 3,3 /pH 4,0 et non codées par la souche de PSU1.</i>	136
<i>Tableau 14 : Liste des protéines identifiées chez la souche 14215 en présence de 5 g/L d'extrait T1.</i>	158

Introduction

L'élaboration d'un vin nécessite l'action de différents microorganismes avec dans un premier temps l'intervention d'une levure telle que *Saccharomyces cerevisiae* permettant la production d'alcool et de dioxyde de carbone. Puis, dans certains cas, par exemple dans des vins rouges ou des vins blancs trop acides, la fermentation malolactique peut être effectuée par des bactéries lactiques, le plus souvent l'espèce *Oenococcus oeni*, dégradant l'acide L-malique en acide L-lactique. La fermentation malolactique joue un rôle essentiel dans la stabilisation microbiologique et la qualité organoleptique du vin par une diminution de l'acidité et la production d'arômes et de métabolites secondaires.

La diversité des souches d'*O. oeni* a été étudiée afin de comprendre les différences de capacité d'adaptation selon le type de vin (vin rouge, vin blanc...) ou le type de produit (cidre, vin, Champagne...). Dans le cadre de l'étude de la diversité d'*O. oeni*, des travaux précédents ont permis d'isoler un grand nombre de souches dans différentes régions géographiques (Khoury et al., 2016). Des souches formant différents groupes phylogénétiques spécifiques de différents produits (Cidre, vin blanc et vin rouge de Bourgogne) ont notamment pu être identifiées. Plus tard, un autre travail a permis d'étudier les relations phylogénomiques des deux groupes de souches des vins de Bourgogne (Campbell-Sills, 2015) (Figure 1). Les vins de Bourgogne présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes, par exemple la forte acidité des vins blancs et la présence de composés phénoliques dans les vins rouges. Ces stress pourraient donc être à l'origine de l'adaptation des deux groupes de souches à ces deux types de vins.

Les souches commerciales d'*O. oeni* sont également connues pour leurs bonnes capacités d'adaptation aux vins et sont donc intéressantes pour l'étude des mécanismes de résistance aux stress, particulièrement en ce qui concerne l'acidité et les polyphénols.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier l'influence des différences de tolérance à l'acidité et aux polyphénols des souches d'*O. oeni* sur leur l'adaptation au(x) vin(s), ainsi que les mécanismes mis en place pour résister aux stress. Nous avons donc souhaité travailler sur les deux groupes de souches provenant de vin rouge (VR) et vin blanc (VB) de Bourgogne, ainsi que sur des souches commerciales afin d'étudier leurs phénotypes et identifier les mécanismes de résistance aux stress.

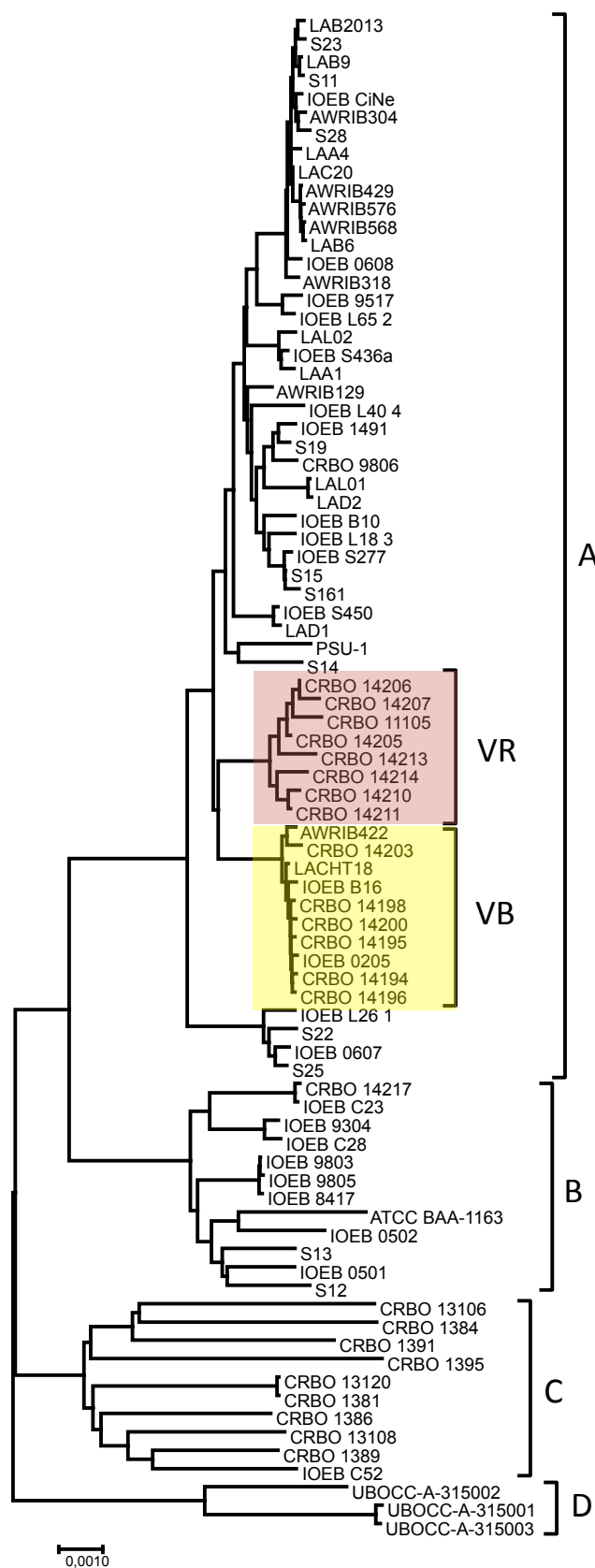


Figure 1 : Arbre phylogénomique de souches d'*O. oeni* (Campbell-Sills, 2015).

Ainsi dans un premier temps, nous avons réalisé une étude phénotypique sur les souches VB et VR afin de comprendre leur adaptation dans le moût et dans différents types de vin en fonction des niveaux d'acidité, puis du type et de la concentration en extrait polyphénolique ajouté. Cette étude phénotypique a également impliqué, la caractérisation morphologique des souches par microscopie électronique à transmission.

Puis dans une seconde partie, nous avons caractérisé les phénotypes des souches commerciales en fonction de leur mode de préparation (lyophilisée ou non) pour différents niveaux d'acidité. De plus, deux souches résistantes à l'acidité ont été étudiées par analyse protéomique afin d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance au stress acide dans le vin.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons souhaité caractériser les différents phénotypes des souches commerciales toujours en fonction de leur mode de préparation par rapport à trois extraits polyphénoliques ainsi que leur morphologie cellulaire par MET. L'identification des mécanismes de résistance a été dans un premier temps envisagée par une étude de séquençage des ARN totaux (RNAseq). Toutefois, après différentes mises au point au niveau des protocoles d'extraction d'ARN, nous avons opté pour une approche de l'évaluation du protéome avec la mise en place d'études préliminaires afin de valider ou non le protocole de préparation des échantillons. L'ajout d'extrait polyphénolique a également dans ce cas perturbé l'analyse et nécessité une optimisation pour le nettoyage des extraits protéiques et permettre leur analyse. L'étude protéomique visait comme précédemment à comprendre les mécanismes de résistance en fonction de la concentration en polyphénols.

Étude bibliographique

I. Le vin et ses fermentations

Le vin est le produit de la fermentation alcoolique (FA) totale ou partielle de raisins ou de moût de raisin. Les premières traces de sa production remontent au tout début de la civilisation. Cependant, il a fallu attendre le XIX^e siècle et notamment les travaux de Louis Pasteur pour entrevoir le rôle des levures dans la fermentation alcoolique et celui des bactéries dans d'autres transformations. Dans ses mémoires sur la fermentation alcoolique, Pasteur écrit en 1857 : « Le dédoublement du sucre en alcool et en acide carbonique est un acte corrélatif d'un phénomène vital... organisation à laquelle le sucre prend une part directe, fournissant une portion des éléments de la substance de ces globules » (N.B. Levures) (Pasteur, 1857). Pasteur décrira également les principales altérations du vin qui résultent de l'action de bactéries, comme la maladie de la graisse, l'amertume, la tourne ou les piqûres lactiques et acétiques (Pasteur, 1857). Aujourd'hui, on sait que le vin est obtenu grâce à l'action des levures qui réalisent la FA, mais que les bactéries sont également importantes, car elles réalisent une seconde fermentation, qui est certes facultative, mais largement répandue dans la production des vins rouges et de certains vins blancs, la fermentation malolactique (FML).

I.1. Principe de l'élaboration du vin

Les principales étapes de l'élaboration du vin peuvent varier en fonction du type de vin ou de la zone géographique dont il est originaire (Bourgogne, Bordelais, etc) (Figure 2).

De manière générale, il existe de nombreuses variations dans ce schéma de vinification évoluant en fonction des contraintes techniques, du cahier des charges des appellations ou encore des attentes du consommateur. Ainsi, la vendange peut dans un premier temps être éraflée afin d'éliminer les parties solides de la vigne des baies de raisin. Dans le cas des vins blancs, l'étape de pressurage est effectuée avant la FA afin d'éviter la coloration du moût par les polyphénols. Le vin est donc ensuite encuvé, avant d'être débourbé et soutiré, permettant ainsi une clarification du moût. Puis, la FA est effectuée suivie dans certains cas d'une FML comme pour les vins blancs de Bourgogne. Dans le cas des vins rouges, la cuvaison du jus et des parties solides permet une macération afin d'extraire les composés phénoliques avant et pendant la FA. Après la FA, le vin de goutte est récupéré tandis que le reste des parties solides (le marc) subissent le pressurage permettant de recueillir le vin de presse, plus riche en matière colorante. Un assemblage peut dans certains cas être effectué avant la FML. Cependant, les deux types de vins (de goutte et de presse) précédemment obtenus peuvent également subir la fermentation malolactique de manière séparée. D'autres variations existent néanmoins en ce qui concerne la

réalisation de ces fermentations par exemple une co-inoculation levurienne et bactérienne ou une FA non totale c'est-à-dire un vin contenant des sucres résiduels.

Les deux types de vin, après avoir été soutirés et sulfités, peuvent être conservés pendant plusieurs mois en fût ou en cuve afin d'effectuer leurs élevages permettant ainsi leur évolution aromatique. Enfin, les vins sont soutirés et le cas échéant assemblés avant de subir une dernière étape de clarification du vin (collage et/ou filtration) pour la mise en bouteille.

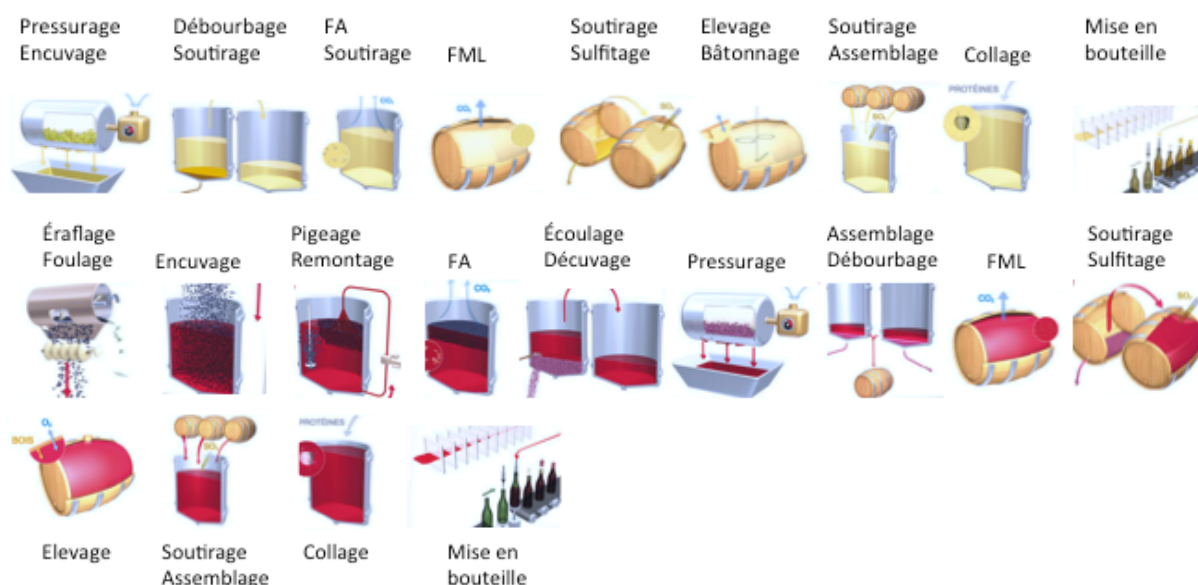


Figure 2: Principes généraux de la fabrication du vin blanc et du vin rouge de Bourgogne.
(Illustration BIVB)

I.2. La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est la première fermentation intervenant dans la fabrication vin permettant la transformation du moût en vin grâce à la production d'éthanol par les levures indigènes présentes initialement sur la vendange ou par les levures commerciales. L'espèce effectuant majoritairement cette fermentation est *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, plus d'une vingtaine d'autres espèces de levures peuvent être présentes, dont notamment des *Brettanomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora* ou encore *Candida* (Renouf et al., 2007).

Lors de la fermentation, les levures vont consommer les sucres fermentescibles contenus dans le raisin afin de se développer. Ainsi, la consommation d'une molécule de glucose engendre la formation de deux molécules d'éthanol et la libération de dioxyde de carbone (CO_2).

De plus, la levure, grâce à ses activités estérases, va par ailleurs former différents types d'esters comme l'acétate d'isoamyle associé à l'arôme de banane, l'acétate de phényléthyle qui est un marqueur de la rose, ou bien l'hexanoate d'éthyle correspondant à l'arôme pomme verte.

Cependant, la souche de levure réalisant la fermentation a une grande importance notamment sur le niveau des composés aromatiques, ainsi que sur la perception du caractère fruité (Gammacurta et al., 2017).

Enfin, une fois la FA terminée, lorsque les levures ont consommé la quasi-totalité des sources carbonées une importante mortalité apparaît. Cette autolyse des levures a un effet stimulant sur la croissance des bactéries lactiques du vin (Guilloux-Benatier, 1985).

I.3. La fermentation malolactique

I.3.1. Rôle physiologique

La FML survient généralement après la FA, car elle est produite par les bactéries lactiques qui se développent plus facilement après l'autolyse de levures. Elle consiste en la transformation de l'acide L-malique en acide L-lactique avec une production de CO_2 et l'utilisation de deux cofacteurs NAD^+ et Mn^{2+} (Figure 3). Cette réaction permet la production de 0,67 g d'acide lactique et 0,33 g de CO_2 à partir de 1 g d'acide malique.

Cependant, il ne s'agit pas à proprement parler d'une fermentation, mais d'une décarboxylation enzymatique sans passage par des molécules intermédiaires. L'enzyme malolactique qui permet cette décarboxylation a été purifiée et caractérisée pour la première fois chez *Lactobacillus plantarum*, en 1975 (Lonvaud, 1975) (Lonvaud et al., 1977).

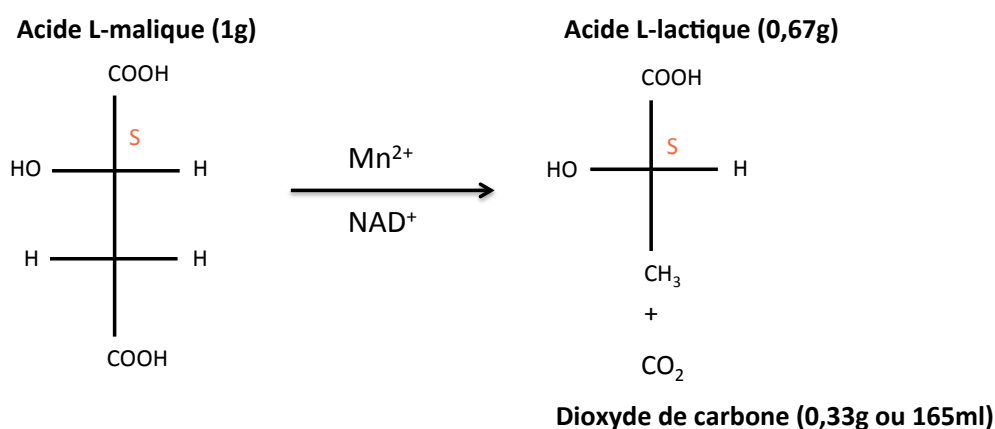


Figure 3: La fermentation malolactique : équation de la réaction et stéréochimie.

Cette enzyme est composée de deux sous unités protéiques de 60 kDa (Ansanay et al., 1993). Elle nécessite la présence de Mn^{2+} et NAD^+ pour son activité, qui est optimale à une température de 37 °C et un pH de 5,9 lorsqu'elle est purifiée. Dans le vin, les acides carboxyliques tels que l'acide

succinique, citrique et tartrique vont être des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme malolactique tandis que l'acide lactique, lui, est un inhibiteur non compétitif (Lonvaud Funel & de Saad, 1982).

L'entrée de l'acide malique non chargé dans la cellule se fait par transport passif (diffusion à travers la membrane) à hauteur de 50 % du transport à pH 3,2 alors qu'au-delà de pH 4,5 le transport passif est de 0 % (Tourdot-Maréchal et al., 1993). Lorsque le pH est plus élevé (au-delà de pH 3,2), l'acide malique rentre principalement sous forme anionique dans la cellule par un transporteur appelé malate perméase générant ainsi un gradient de potentiel électrique $\Delta\psi$ négatif à l'intérieur (Loubiere et al., 1992) (Salema et al., 1994) (Salema et al., 1996). Une fois à l'intérieur de la cellule, l'acide L-malique va être décarboxylé par l'enzyme malolactique.

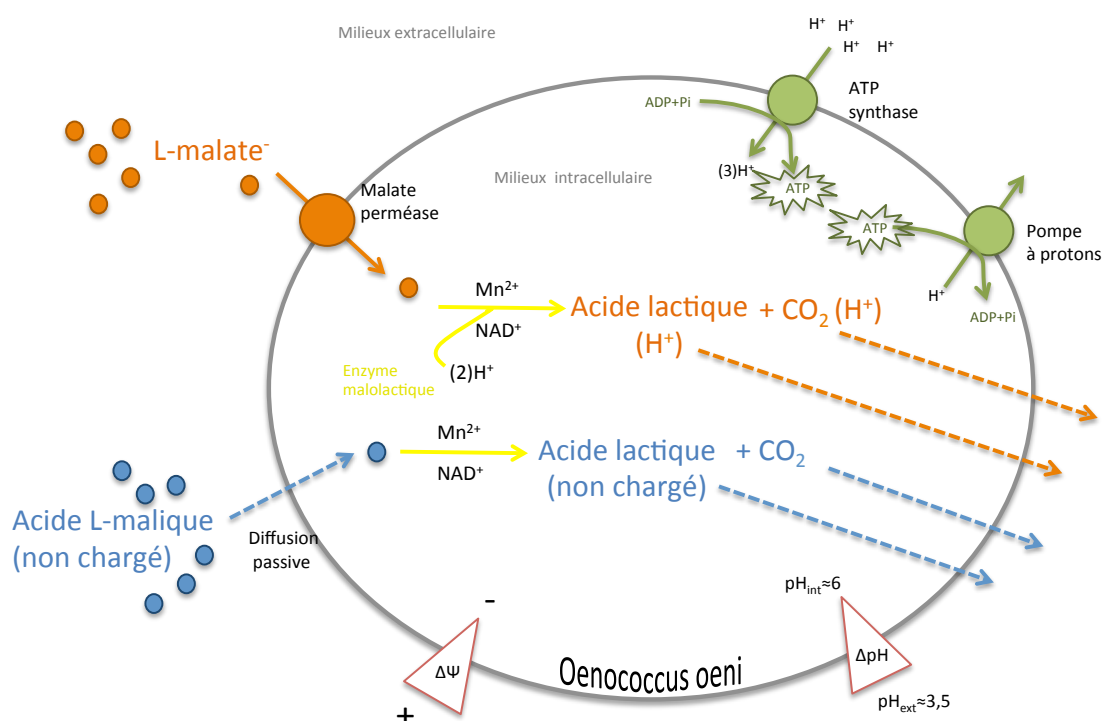


Figure 4: Transport de l'acide malique chez *O. oeni* et rôle de la FML pour le maintien du pH interne.

Schéma réalisé à partir de (Loubiere et al., 1992) ; (Tourdot-Maréchal et al., 1993) ; (Salema et al., 1994) ; (Salema et al., 1996) ; (Cox & Henick-Kling, 1995) ; (Bartowsky, 2005) ; (Bouix & Ghorbal, 2015)

L'acide lactique et le CO₂ formés lors de la FML à partir du L-malate sous forme anionique vont être excrétés hors de la cellule permettant la sortie de deux protons H⁺ ainsi que l'augmentation du pH interne (Figure 4) (Bouix & Ghorbal, 2015). Cette différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (ΔpH), ainsi que la présence d'un gradient de potentiel électrique $\Delta\psi$ sont favorables à la création d'une force proton motrice permettant l'entrée de protons H⁺ via le

transporteur ATPase (Cox & Henick-Kling, 1989) (Salema et al., 1994) (Cox & Henick-Kling, 1995).

La FML va donc permettre la création d'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique, source d'énergie pour la cellule via l'entrée de trois protons dans la cellule. D'autres travaux ont montré que des souches dont l'ATPase était désactivée, avaient perdu leur capacité à effectuer la FML (Tourdot-Maréchal et al., 1999) (Galland et al., 2003).

Le gène de l'enzyme malolactique, *mleA*, fait partie d'un opéron contenant également le gène de la malate perméase, *mleP*. Ils sont précédés par le gène *mleR*, qui code pour un régulateur de transcription spécifique de l'opéron malolactique (Labarre et al., 1996) (Figure 5).

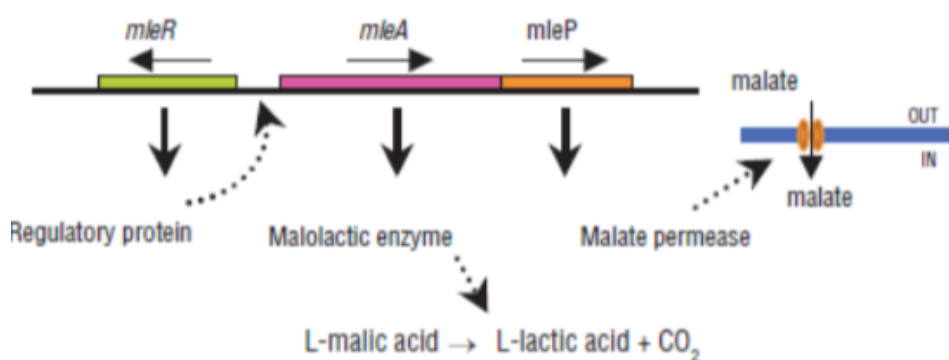


Figure 5: Organisation de l'opéron malolactique chez *O. oeni* (Bartowsky, 2005).

D'autres auteurs ont mis en évidence des changements de l'état physiologique de *O. oeni* en fonction de la phase de la FML (Bouix & Ghorbal, 2015) (Figure 6). En effet, ils ont montré que pendant la phase de latence, le ΔpH est proche de 0 ainsi que le $\Delta \psi$. Le ΔpH est lui à son maximum lors de la phase exponentielle, tandis que $\Delta \psi$ est inférieur à 0 permettant l'entrée de protons et la création d'ATP nécessaire à la cellule. Enfin, ces gradients tendent vers 0 lorsque l'acide malique a été entièrement consommé et l'ATP est alors nécessaire pour faire sortir les protons de la cellule. Ces études montrent donc l'importance de la FML dans la survie d'*O. oeni* dans un milieu difficile comme peut l'être le vin.

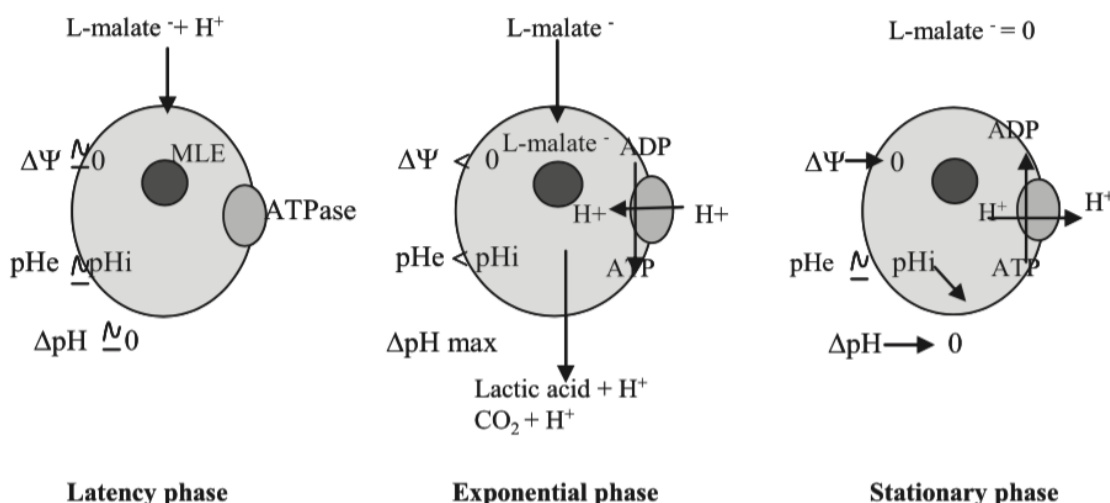


Figure 6 : Force proton motrice et fermentation malolactique (Bouix et al. 2015).

I.3.2. Intérêt œnologique

Pour le vinificateur, la FML a deux rôles fondamentaux : elle permet (i) une amélioration organoleptique générale du vin, et (ii) une amélioration de la stabilité microbiologique du vin. En outre, elle induit une complexification de la fraction aromatique.

L'amélioration organoleptique engendrée par la FML passe tout d'abord par le remplacement de l'acide malique par l'acide lactique, ce qui correspond à l'élimination de la verdeur acide caractéristique de la pomme verte, au profit d'un goût lacté plus doux et moins agressif. Cela va permettre notamment aux vins rouges d'acquérir des caractères moelleux, charnu et gras. De plus, il s'ensuit une augmentation du pH du vin de 0,1 à 0,2 unité de pH qui se traduit au niveau gustatif par un assouplissement du vin et une diminution de l'amertume (Amerine & Roessler, 1976).

La meilleure stabilité microbiologique du vin après FML résulte de la consommation de l'acide malique, des vitamines, des acides aminés et d'autres substrats par les bactéries, ce qui rend leur utilisation impossible dans les étapes suivantes de la vinification et limite donc la possibilité de croissance des microorganismes dans le vin et l'apparition des défauts liés à leur métabolisme.

Par ailleurs, la FML permet la production de métabolites secondaires comme le diacétyle (Butane 2,3-dione) par le métabolisme de l'acide citrique (Perron de Revel, 1992) (Ramos et al., 1995). En effet, chez *O. oeni*, le diacétyle est un métabolite intermédiaire de la production du 2,3-butanediol à partir de l'acide pyruvique. Cependant, même si au cours de la FA les levures peuvent synthétiser le diacétyle par décarboxylation non enzymatique de l' α -acétolactate, soit par association du pyruvate et de l'acétyle-coA, la majorité sera réduite en acétoïne et en

butane -2,3-diol (Perron de Revel, 1992). La FML est donc avec *O. oeni* le principal apport de diacétyle dans le vin. Dans des vins ayant effectué la FML, le diacétyle a été dosé et associé aux caractères doux et beurré (Martineau & Henick-Kling, 1995) (Bartowsky & Henschke, 2004). À faible concentration le diacétyle pourra contribuer positivement à l'expression aromatique des vins tandis qu'en excès de diacétyle peut néanmoins avoir un impact négatif à la dégustation (Rankine & Pocock, 1969). Le diacétyl est un composé α -dicarbonylé (Figure 7) comme d'autres composés du vin comme le glyoxal, le méthylglyoxal, et la pentanedione, eux aussi issus en partie du métabolisme des bactéries lactiques. Ces molécules sont extrêmement réactives notamment avec la cystéine du vin conduisant à des hétérocycles de type thiazole associés aux descripteurs aromatiques « pop corn », grillé, noisette, ou de type thiophène et furane correspondant aux notes café et caoutchou (Marchand et al., 2000).

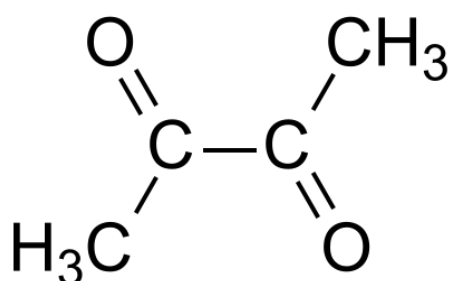


Figure 7 : Structure chimique du diacétyle.

De plus, de Revel et son équipe ont montré l'impact de la FML en barrique sur l'arôme boisé du vin de par l'augmentation de la perception des notes fumées, toastées, vanillées, beurrées et épicées (de Revel et al., 1999).

Néanmoins, l'influence de la FML sur l'arôme fruité et ses composés tant recherchés par les vinificateurs ne suscitent pas de consensus. En effet, certaines études ont montré que les bactéries lactiques via la réalisation de la FML diminuaient l'arôme fruité du vin notamment pour les notes de fruits rouges dans le Pinot noir, ainsi que les notes de pomme et d'agrumes pour les vins de Chardonnay (Sauvageot & Vivier, 1997) ou encore celles de cassis et d'abricot dans des vins de Tannat (Gambaro et al., 2001). Antalick et son équipe n'ont cependant pas observé de diminution des arômes fruités en corrélation avec une augmentation des arômes lactés, mais plutôt la présence d'un masquage de l'arôme fruité par les notes toastées et fumées (Antalick et al., 2012). La souche bactérienne réalisant la FML a un rôle primordial sur l'arôme fruité des vins (Mcdaniel et al., 1987) (Boido et al., 2009) particulièrement de par une expression différente des estérases (Sumby et al., 2010), ce qui pourrait expliquer cette absence de consensus sur son impact aromatique.

II. La bactérie lactique : *Oenococcus oeni*

II.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont pour principale caractéristique la production d'acide lactique à partir de carbohydrates. Ce groupe phylogénétique est constitué d'environ 500 espèces appartenant à 6 familles bactériennes différentes, mais toutes à coloration de Gram positif et catalase négative : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* et *Leuconostocaceae* (Mozzi et al., 2015). Les relations phylogénétiques entre ces familles sont présentées en Figure 8.

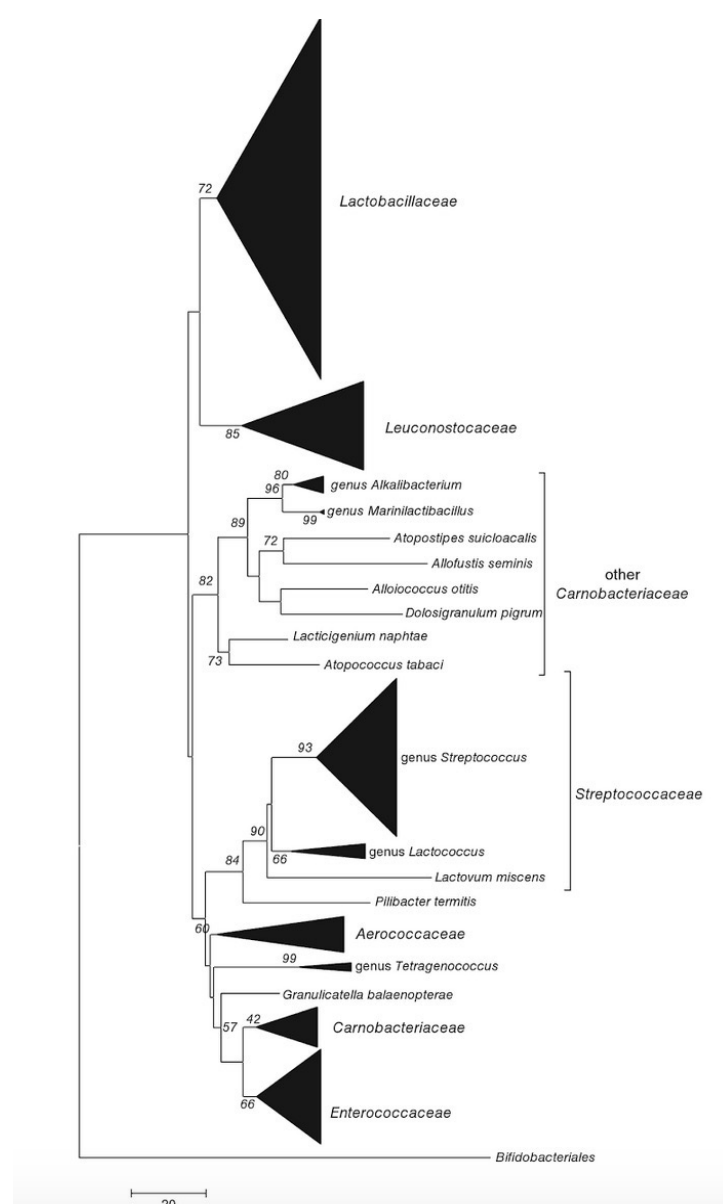


Figure 8: Arbre phylogénétique des familles de l'ordre des Lactobacillales basé sur les séquences des gènes d'ARNr 16S (Mozzi et al., 2015).

La famille des *Leuconostocaceae* regroupe les genres *Oenococcus*, *Weisella*, *Fructobacillus* et *Leuconostoc*. Les bactéries lactiques sont associées à de nombreux aliments fermentés tels que les laitages (fromages, yaourts), les charcuteries (saucisses, jambons), mais également la choucroute, les olives et des boissons telles que le cidre, la bière ou les vins (Axelsson & Ahrné, 2000).

Les principaux genres de bactéries lactiques présentes dans le moût de raisin et dans les vins sont *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus* (Ribéreau-Gayon et al., 2012a). Les espèces bactériennes isolées du vin peuvent être différenciées notamment par leur morphologie (coques ou bacilles) et leur caractère fermentaire vis-à-vis du glucose (hétérofermentaire, hétérofermentaire facultatif ou obligatoire, et homofermentaire). Certaines bactéries isolées du vin ont été identifiées comme des bactéries pouvant entraîner dans certains cas des défauts par exemple la maladie des vins filants avec *Pediococcus damnosus* (Lonvaud-Funel et al., 1993), renommée plus tard *Pediococcus parvulus* (Werning et al., 2006).

II.2. La bactérie lactique du vin, *Oenococcus oeni*

La présence de bactéries dans le vin a été décrite pour la première fois par Pasteur en 1858, mais il les a associées uniquement à l'apparition de défauts (Pasteur, 1857). Leur rôle dans la dégradation de l'acide malique en acide lactique n'a été décrit que quelques dizaines d'années plus tard (Figure 9). Depuis lors, de nombreuses découvertes et avancées ont été faites jusqu'à très récemment et la réalisation de séquençage du transcriptome chez *O. oeni* durant la FML (Sternes et al., 2017).

L'espèce bactérienne la plus souvent associée à la FML a été décrite pour la première fois par Garvie en 1967 (Garvie, 1967). Elle a été classée dans le genre des *Leuconostocs* sur la base de critères morphologiques, physiologiques et biochimiques et nommée *Leuconostoc oenos*. Puis, elle a été reclassée et renommée sur la base de données moléculaires, en particulier sa position phylogénétique dans des arbres construits d'après la séquence des gènes d'ARN 16S (Dicks et al., 1995). Il est apparu évident qu'elle est éloignée des *Leuconostocs*, de même que d'autres genres. Un nouveau genre a donc été créé spécialement pour cette espèce et fut désignée *Oenococcus oeni* (Dicks et al., 1995). *O. oeni* a longtemps été la seule espèce appartenant à ce genre jusqu'à la découverte d'*Oenococcus kitaharae* et d'*Oenococcus alcoholitolerans*, respectivement dans des résidus de distillation de shochu au Japon et dans des productions de cachàça et de bioéthanol au Brésil (Endo, 2006) (Badotti et al., 2014).

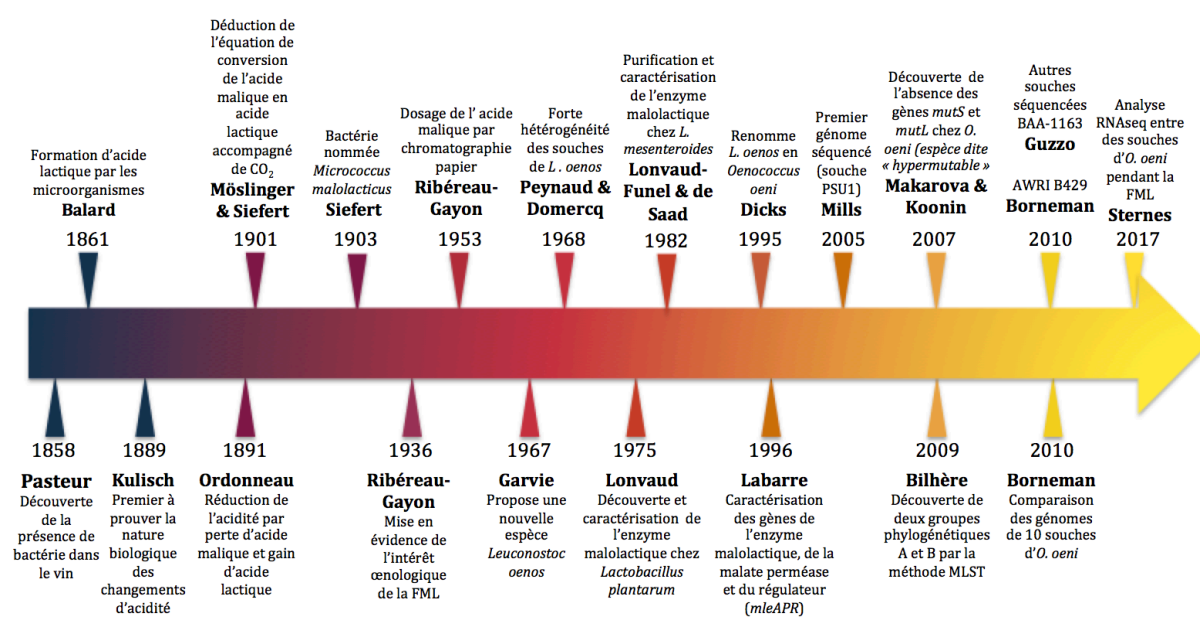


Figure 9: Résumé de l'histoire des bactéries dans le vin et de la FML. Adapté de (Bartowsky & Borneman, 2011).

II.3. Organisation des cellules d'*O. oeni*

Les cellules d'*O. oeni* sont non mobiles, de forme sphérique à ellipsoïde associées en paires ou en chainettes dont la longueur varie selon l'état physiologique des cellules. La taille moyenne des cellules correspond à un diamètre allant de 0,5 à 0,7 μm et une longueur de 0,7 à 1,2 μm (Ribéreau-Gayon et al., 2012a). Il s'agit d'une bactérie anaérobie facultative, chimioorganotrophe, acidophile, hétérofermentaire avec une température optimale de croissance comprise entre 20 et 30 °C (Dicks et al., 1995). Elle peut se développer à des pH très bas comme ceux rencontrés dans le vin (inférieur à pH 3,5), résister à des teneurs élevées en éthanol (10 et 16 %) et à des températures parfois basses (16 à 18 °C).

Lorsqu'on observe une cellule d'*O. oeni* au microscope électronique à transmission (MET), on remarque que la cellule est composée de deux composants majeurs : les enveloppes cellulaires comprenant la membrane plasmique, la paroi et parfois une capsule, et le cytoplasme qui contient le chromosome bactérien (Lonvaud et al., 1977).

La membrane plasmique des bactéries lactiques est composée d'un double feuillet de phospholipidiques dont la partie externe est hydrophile et la partie interne hydrophobe. Les protéines peuvent être enchâssées à travers la membrane vers le peptidoglycane (zone hydrophobe des protéines) ou bien seulement reliées à elle par des liaisons hydrogènes ou ioniques (protéines hydrosolubles). Les différents constituants de la membrane sont reliés par des liaisons hydrophobes (non covalentes) entre les chaînes aliphatiques des lipides et celles des

protéines ce qui permet de rendre l'ensemble assez fluide. Cette membrane est vitale pour la bactérie de par la présence de protéines impliquées dans le transport de substrats et de produits du métabolisme, la synthèse d'énergie et régulation du pH interne (ATPase), sa capacité de détection de signaux environnementaux, mais également pour sa fonction séparative du milieu intracellulaire du milieu extracellulaire.

La paroi des bactéries à Gram+, notamment celle d'*O. oeni* est composée principalement de peptidoglycane. Il est formé de chaînes polysaccharidiques alignées parallèlement les unes aux autres et reliées entre elles par des ponts peptidiques. Les oses qui composent les polysaccharides sont dérivés du glucose : Acide N-acétyl-muramique (NAM) et N-acétyl-glucosamine (NAG) et sont reliés entre eux par des liaisons glucosidiques $\beta(1-4)$ comme le montre la Figure 10.

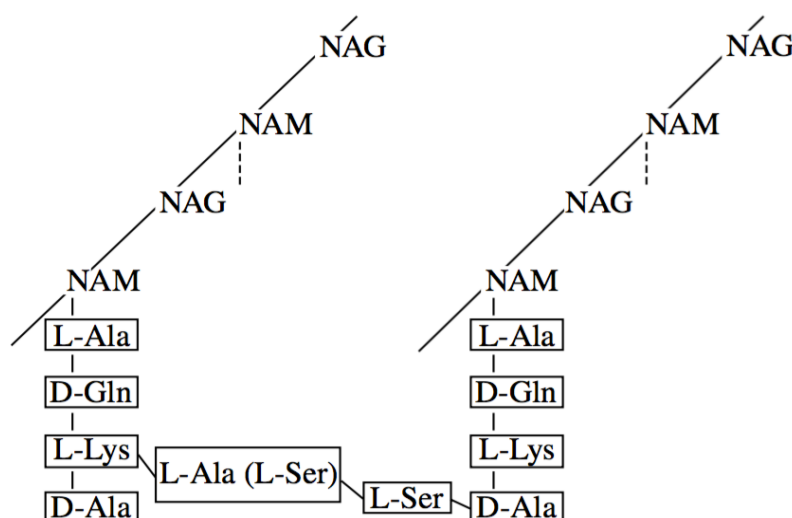


Figure 10: Schéma de la structure du peptidoglycane chez *O. oeni*.

Chez les bactéries lactiques, des polysaccharides peuvent être présents autour de la cellule, alors appelés polysaccharides capsulaires (CPS) ou de manière plus diffuse et éloignés, il s'agit alors d'exopolysaccharides (EPS). Le genre *Pediococcus* a souvent été associé à la présence importante d'EPS entraînant parfois un défaut connu sous le nom de la « maladie de la graisse », dans le vin (Llaubères et al., 1990) (Lonvaud-Funel et al., 1993) (Manca de Nadra & Strasser de Saad, 1995), le cidre (Duenas et al., 1994) (Fernandez et al., 1996) et la bière (Van Oevelen & Verachtert, 1878).

Certaines souches d'*O. oeni* peuvent elles également produire des niveaux différents de polysaccharides durant la FML (Dols-Lafargue et al., 2007) (Dols-Lafargue et al., 2008) (Dimopoulou et al., 2014). De plus, les polysaccharides produits par *O. oeni* pourraient être

impliqués dans la formation de biofilm sur différents supports tels que l'acier inoxydable ou le bois de chêne, permettant une protection contre le stress (Bastard et al., 2016).

L'identification au MET de ces polysaccharides a été effectuée sur deux types de souches présentant une organisation différente au niveau des opérons EPS (Figure 11) (Dimopoulou et al., 2016). Ces résultats visuels de la présence de polysaccharides ont été corrélés avec des mesures de concentrations des EPS solubles ainsi que la détermination de leur composition. Lorsque l'on compare l'aspect visuel de ces EPS d'*O. oeni* avec des observations microscopiques de bactéries connues pour produire de fortes quantités de polysaccharides capsulaires ou d'EPS comme celles présentées dans la Figure 12, il semble que les souches d'*O. oeni* en produisent peu ou bien qu'ils sont difficiles à observer au MET (Dimopoulou et al., 2016).

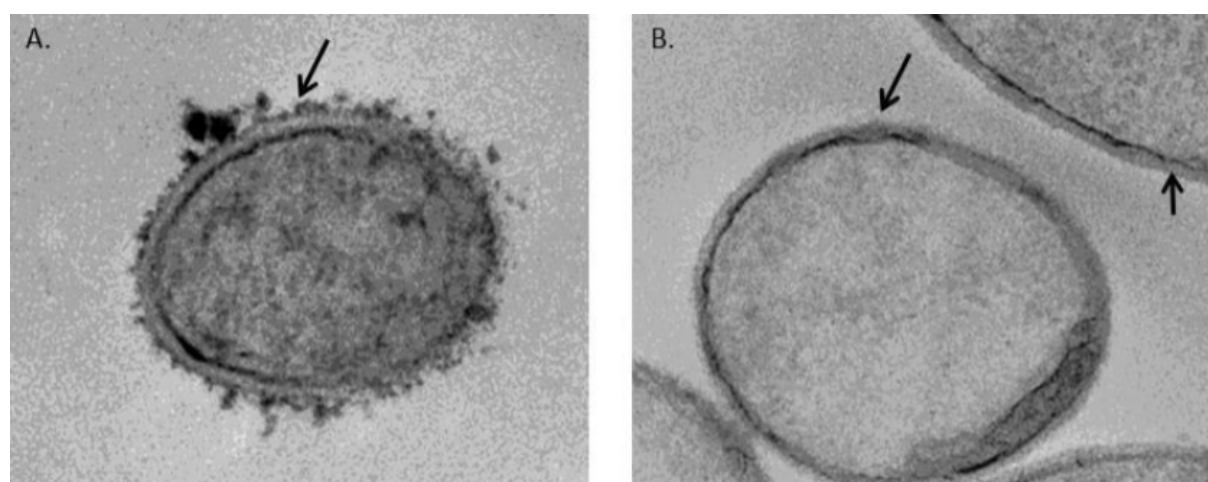


Figure 11: Comparaison d'une souche d'*O. oeni* encapsulée (A) et non encapsulée (B) d'après (Dimopoulou et al. 2016).

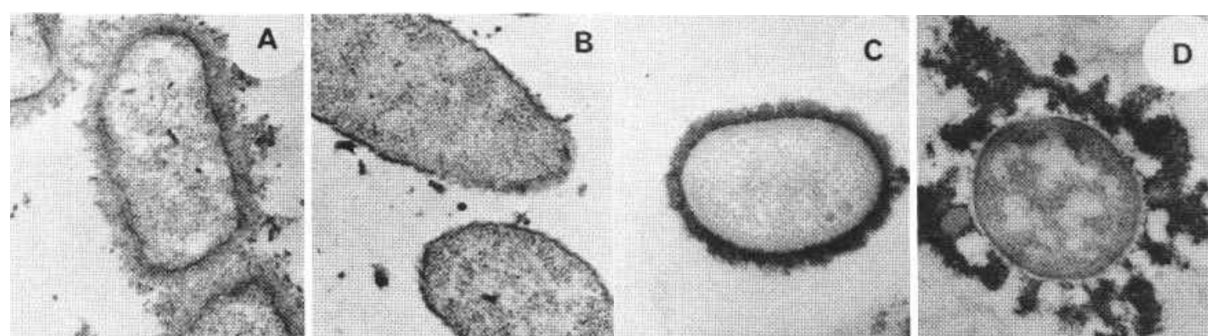


Figure 12: Exemples de bactéries produisant des EPS observés au MET (Whitfield, 1988).

Légende : A : *Escherichia coli*, B : même souche d'*E.coli* que A mais les polysaccharides capsulaires ont été inhibés par des changements de conditions de culture, C : *E coli* K30 avec une capsule discrète, D : *Klebsiella* K20 présentant une forte production d'EPS anionique.

II.4. Le génome d'*O. oeni*

À l'heure actuelle, un seul génome complet d'*O. oeni* a été séquencé, celui de la souche PSU-1 (Mills et al., 2005) (Makarova et al., 2006). Cependant, le nombre de génomes « draft » de souches d'*O. oeni* croît chaque année : 203 sont actuellement publiés sur ncbi. Ils ont une taille moyenne d'environ 1,8 Mb, un GC % de 37,9 % GC et codent pour plus ou moins 1700 protéines. En comparaison, le génome de *Lactobacillus plantarum* a une taille de 3,3 Mb et celui de *Pediococcus parvulus* 2,5 Mb.

O. oeni est une espèce dite « hypermutable » du fait de l'absence de deux gènes impliqués dans le système de correction des mutations de l'ADN (Mismatch Repair MMR) : *mutS* et *mutL* (Makarova & Koonin, 2007) (Marcobal et al., 2008). La protéine MutS cible les erreurs d'appariements au niveau de l'ADN et la protéine MutL se lie à MutS afin d'exciser les bases mal appariées. L'absence de ces gènes entraîne une augmentation significative de la fréquence de mutation que se soit chez *O. oeni* ou d'autres bactéries (Prunier & Leclercq, 2005) (Marcobal et al., 2008) (Bachmann et al., 2012). La plasticité du génome d'*O. oeni* est également liée à la présence d'éléments mobiles, de bactériophages ou de plasmides (Bon et al., 2009). Des éléments mobiles comme les plasmides et les bactériophages peuvent se transférer d'une bactérie à une autre et s'intégrer dans le chromosome, permettant l'acquisition de nouveaux gènes. Ces différents paramètres sont responsables des variations génomiques qui existent entre les souches et contribuent probablement à l'adaptation des souches d'*O. oeni* au vin. Malgré la constante augmentation du nombre de génomes de souches disponibles, le pan génome n'a pas encore atteint son maximum et n'a donc pas encore révélé la totalité de la diversité des gènes de l'espèce (Sternes & Borneman, 2016).

II.5. Biogéographie et diversité intraspécifique de l'espèce

Depuis la description de l'espèce *O. oeni*, de nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'une multitude de souches d'*O. oeni* caractérisées par des génotypes ou phénotypes différents. Diverses études ont été menées afin de comprendre la dynamique de population de l'espèce durant le processus de fabrication du vin, depuis les baies de raisin jusqu'à la fin de la FML (Reguant & Bordons, 2003) (López et al., 2007) (Cappello et al., 2010) (Cruz-Pio et al., 2017). D'autres ont été réalisées pour déterminer s'il existe une distribution particulière des souches en fonction des régions ou des types de vins (Marques et al., 2011) (Khouri et al., 2016) (Franquès et al., 2017) ou encore pour analyser les liens entre des caractères phénotypiques et les génomes (Capozzi et al., 2010) (Zapparoli et al., 2012) (Borneman et al., 2012). Dans ces études, deux hypothèses sont proposées pour expliquer la diversité des souches : soit une

évolution des souches selon leur origine géographique, soit une adaptation selon le type de produit. Récemment, des études ont été réalisées pour déterminer si les microorganismes du raisin et du vin pouvaient être considérés comme une composante à part entière du terroir dans lequel ils se trouvent. L'utilisation du séquençage haut débit d'échantillons issus de différents vignobles de Californie a permis de relier différents types de microorganismes avec les zones géographiques, le climat et les cépages, mettant ainsi en lumière la présence de « terroirs microbiens » (Bokulich et al., 2014). D'autres études ont montré la diversité des souches d'*O. oeni* de la baie de raisin à la FML dans différentes régions vitivinicoles, comme en Espagne (Franquès et al., 2017), au Portugal (Marques et al., 2011), en Italie (Guerrini et al., 2003) ou en France (Khoury et al., 2016). Les souches d'*O. oeni* ne semblent cependant pas être génétiquement spécifiques d'une région donnée, car les mêmes souches (ou des souches génétiquement proches) peuvent être présentes dans des régions éloignées (Larisika et al., 2008) (Khoury et al., 2016). On peut néanmoins trouver des souches qui persistent au sein d'un même chai d'une année à l'autre, pouvant ainsi contribuer à une certaine typicité temporelle d'un vin (Reguant & Bordons, 2003) (Pramateftaki et al., 2012).

La distribution phylogénétique des souches a été étudiée par la méthode MLST (Multilocus sequence typing). L'analyse d'une cinquantaine de souches a tout d'abord montré qu'elles se répartissent en deux groupes génétiques, nommés A et B, et qu'il existe des sous-groupes liés à la matrice d'isolement comme le champagne ou le cidre (Bilhère et al., 2009). Une autre étude portant sur plus de 250 souches a confirmé l'existence des groupes A et B et suggéré l'existence d'un troisième groupe C et également de sous-groupes de A associés à des régions géographiques comme le Chili, l'Afrique du Sud, ou l'Est de la France et un sous-groupe de B contenant exclusivement des souches isolées du cidre (Bridier et al., 2010). Par la suite, les séquences génomiques d'une centaine de souches ont été utilisées pour construire un arbre phylogénomique de l'espèce confirmant l'existence des groupes A, B et C et qui a révélé un quatrième groupe, D, contenant des souches nouvellement isolées de kombucha, un thé fermenté de faible teneur en alcool (Campbell-Sills, 2015) (Figure 1).

Cette distribution phylogénétique a non seulement permis d'identifier des groupes ou sous-groupes génétiques de souches associées à des types de produits particuliers (champagne, cidre, kombucha), mais elle suggère également que l'espèce a été domestiquée pour se développer dans le vin. Il a été suggéré que des souches ancestrales d'*O. oeni* se sont dans un premier temps adaptées à un environnement pauvre en éthanol, comme les fruits trop murs, puis à des teneurs plus importantes en alcool, dans des produits comme le cidre ou le vin (Campbell-Sills, 2015). De plus, deux sous-groupes de souches ont été identifiés dans les vins blancs et rouges de Bourgogne (Khoury, 2014). Leur proximité phylogénétique suggère qu'ils sont issus d'une seule souche ancestrale (Campbell-Sills, 2015).

II.6. Recherche de corrélations entre le génome et les phénotypes des souches

Les données de génomique ont été utilisées dans plusieurs études pour rechercher des liens entre la diversité des souches d'*O. oeni* et des phénotypes particuliers. De nombreuses variations ont été observées dans les génomes, par exemple au niveau de la biosynthèse des acides aminés, du métabolisme des sucres, ou de la compétence.

En ce qui concerne la biosynthèse des acides aminés, certains auteurs ont pu observer des différences génotypiques entre les souches (Sternes & Borneman, 2016) (Borneman et al., 2012). En effet, bien que la capacité à synthétiser la glutamine, la glycine, la sérine, la cystéine, la proline, l'aspartate et la thréonine est bien conservée dans la majorité des souches, dans certains cas des mutations entraînent une incapacité à produire certains acides aminés. Ainsi, certains groupes de souches sont incapables de produire l'aspartate, la thréonine, ou la leucine du fait d'une mutation au niveau d'enzymes clés de leur métabolisme de biosynthèse comme l'orthophosphate pyruvate dikinase, l'homoserine kinase ou encore la 3-isoproylmalate isomérase (Borneman et al., 2012). Cette incapacité à synthétiser certains acides aminés essentiels peut entraîner des difficultés lors de la croissance en milieu pauvre en nutriment (Fourcassie et al., 1992) (Terrade & Mira de Orduña, 2009).

De même, l'étude génomique et phénotypique du métabolisme des sucres a montré que les souches d'*O. oeni* pouvaient consommer une quantité variable de carbohydrates en fonction du groupe phylogénétique auquel elles appartiennent (Cibrario et al., 2016). Ainsi, les souches appartenant au groupe A peuvent croître sur un minimum de 6 carbohydrates tandis que les souches du groupe B sur un minimum de 10 avec néanmoins une forte hétérogénéité des phénotypes entre les souches de chaque groupe. Ces variations de phénotypes ont pu être corrélées à l'absence ou l'inactivation de gènes codants pour des transporteurs, des enzymes de phosphorylation (phosphotransférases PTS) ou bien d'hydrolyse (Cibrario et al., 2016). Ces résultats sont corrélés avec les comparaisons génomiques présentes dans d'autres travaux notamment en ce qui concerne les PTS (Borneman et al., 2012) (Sternes & Borneman, 2016).

Les variations génomiques et phénotypiques des souches qui concernent la synthèse d'exopolysaccharides ont également beaucoup été étudiées en raison de leur rôle protecteur vis-à-vis des stress (Roberts, 1996), de leur intérêt lors de la production des levains industriels (Dimopoulou et al., 2016) ou de leur implication dans la formation de biofilms (Bastard et al., 2016). La capacité à produire des polysaccharides capsulaires ou des EPS a été dans un premier temps limitée à quelques souches lors d'une étude génomique (Borneman et al., 2010) et des études phénotypiques (Ibarburu & Díaz, 2007) (Ciezack et al., 2010) (Dimopoulou et al., 2012), puis de manière plus généralisée à d'autres souches (Borneman et al., 2012) et aux groupes phylogénétiques A et B (Dimopoulou et al., 2014) (Dimopoulou et al., 2016). Ces études ont

notamment montré la présence de deux opérons de synthèse d'hétéropolysaccharides (EPS1 et 2), ainsi que des gènes isolés codants pour des glycosidases ou des glycosyltransférases (*dsrO*, *dsrV*, *levO*, *gtf*, *it3*, *it4*). L'opéron EPS 1 comprend trois types d'organisations (A, B et C) avec une taille variant de 10,9 à 16,5 kb. L'opéron EPS 2 peut être organisé selon 15 modèles différents, avec des enzymes aux pourcentages d'identités très variables. La taille de l'opéron EPS2 varie de 5,4 kb, pour celui comprenant le moins de gènes, jusqu'à 20,6 Kb pour le plus grand, chez la souche BAA-1163.

La recherche de corrélation entre ces opérons et des phénotypes spécifiques a montré que l'absence de l'opéron EPS 2, ou la présence d'une forme tronquée où il manque une majorité des glycosyltransférases induisent l'absence de CPS. Néanmoins, la souche BAA-1163, qui présente une encapsulation, ne possède pas la glycosyltransférase primaire de l'opéron EPS 2. Son activité pourrait être remplacée par celle d'enzymes codées par d'autres gènes, comme *woaA* ou *it3* (Dimopoulou et al., 2014). De plus, le rôle de l'EPS 1 n'a pas pu être précisé à l'heure actuelle.

Cependant, de nombreux phénotypes qui diffèrent d'une souche à une autre n'ont pas encore d'explication au niveau génomique. En particulier, les performances techniques comme la synthèse de composés aromatiques (Campbell-Sills, 2015) ou la résistance aux stress (Margalef-Català et al., 2016a) sont encore source de recherche, notamment pour aider à la sélection de levains industriels.

III. Les facteurs de stress du vin et leur impact sur les bactéries lactiques

En microbiologie, la notion de stress correspond à une brusque modification de l'homéostasie cellulaire due à un ou des changements environnementaux. Le stress va ainsi moduler l'expression du génome et du protéome impactant sur la croissance de la cellule et sur sa capacité de survie (Booth, 2002). On peut différencier deux types de stress : le stress prolongé permettant une adaptation progressive de la bactérie et le stress par choc permettant d'observer leur survie par activation des systèmes de résistances. La mise en place d'un maximum de mécanismes de résistance chez certaines souches d'*O. oeni* est particulièrement recherchée pour le développement de levains malolactiques.

III.1. Les différents stress du vin

Le vin a des caractéristiques physico-chimiques et une composition complexes (pH, SO₂, éthanol, carbohydrates, acides gras, polyphénols, acides aminés, etc.) qui varient en fonction des cépages, des paramètres environnementaux et des choix de vinifications. Les principaux facteurs pouvant avoir un impact sur la croissance et la survie bactérienne dans le vin sont le pH, la température,

le degré d'alcool, la concentration en SO₂, mais également la présence de polyphénols. Ils représentent des stress aux effets synergiques sur les souches d'*O. oeni*.

L'ensemble des stress présents dans le vin et leurs mécanismes d'inhibition chez *O. oeni* est résumé dans le Tableau 1.

Tableau 1: Principaux inhibiteurs du vin pour *O. oeni* et leurs mécanismes d'actions.

Adapté de (Betteridge et al., 2015)

Facteur d'inhibition	commentaires	Conditions optimales	Conditions moyennes du vin	Mécanismes d'inhibition	Références
pH faible	Acidité varie en fonction du cépage ou des choix de vinification	4,8 -5,5	2,7 – 3,5	Diminue la croissance et la FML	(Davis et al., 1985) (Guzzo et al., 1994) (Tourdot-Maréchal et al., 2000)
Éthanol	Produit durant la FA	Stimulation de la croissance à partir de 5 %	11 - 15 % (v/v)	Endommage la membrane et altère la fluidité	(Britz & Tracey, 1990) (Couto et al., 1996) (Da Silveira et al., 2002) (Da Silveira et al., 2003) (Da Silveira & Abee, 2009)
Température faible	Les FML sont le plus souvent réalisées à température ambiante	25 °C	12 - 20 °C	Affecte le taux de croissance et augmente la phase de latence	(Henick-Kling, 1993) (Guzzo et al., 1994) (Tourdot-Maréchal et al., 2000)
SO₂	Produit par la levure et ajouté par le vinificateur pour prévenir des altérations des microorganismes	0 mg/L	10-70+ mg/L total	Diminue l'activité ATPasique et la viabilité cellulaire	(Henick-Kling, 1993) (Romano & Suzzi, 1993) (Carreté et al., 2002)
Polyphénols	L'inhibition ou la stimulation varie en fonction des composés et des études scientifiques	Voir Tableau 2	Vin rouge : 1,0 – 4,0 g/L de polyphénols totaux	Adsorption à la paroi, altération membrane, modification métabolique	(Rozès & Peres, 1998) (Bossi et al., 2007) (Campos et al., 2009) (Chasseriaud et al., 2015)

III.1.1. Le pH

Le vin est une solution « tampon » acido-basique composée de différents acides contribuant chacun de façon plus ou moins importante à l'acidité réelle vin. L'influence du pH sur les microorganismes est majeure dans le vin notamment sur la durée de la phase de latence et de la FML, sur la croissance et la survie d'*O. oeni*, la sélection des souches et de leurs activités métaboliques (Davis et al., 1985) (Henick-Kling, 1993). Ainsi, aux pH les plus faibles : pH 2,8 - 3,0, toutes les souches d'*O. oeni* ne sont pas capables de survivre ou de se développer, et celles qui le peuvent ont une croissance lente. Dans un environnement acide, les bactéries ont des difficultés à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité, ce qui peut causer des dommages sur les protéines, une diminution des activités enzymatiques (Brul & Coote, 1999), ainsi que des dommages sur l'ADN (van de Guchte et al., 2002). Cependant, *O. oeni* est l'espèce qui tolère le mieux les pH inférieurs à 3,5, ce qui explique sa prédominance dans les vins par rapport aux autres espèces bactériennes (Wibowo et al., 1985). Aux pH les plus élevés du vin : pH 3,6 - 3,8 la croissance est beaucoup plus rapide pour *O. oeni* mais également pour les autres bactéries moins acidophiles présentes dans le vin comme *Lactobacillus* et *Pediococcus spp* (Wibowo et al., 1985) (Henick-Kling, 1993).

Même si *Oenococcus oeni* est une bactérie acidophile, sa capacité de croissance dans un milieu comme le vin est remarquable, notamment parce que la plupart des enzymes présentes chez cette bactérie ont un pH optimum d'activité proche de 7. Ainsi, l'enzyme malolactique à un pH optimum une fois purifiée de 5,9 alors que l'activité malolactique elle, est optimale à pH 3,0-3,2 (Lonvaud, 1975). Néanmoins la survie d'*O. oeni* dans un vin acide peut être augmentée lorsque les cellules ont subi au préalable un choc acide ou thermique avant l'inoculation (Guzzo et al., 1994) (Guzzo et al., 1997) (Guzzo et al., 2000). Ce prétraitement permet la synthèse de protéine de stress dont la majorité sont des protéines chaperon ou des protéases.

L'acidité joue un rôle fondamental dans la sélection de souches les mieux adaptées, mais son effet inhibiteur est synergique avec ceux des autres paramètres physicochimiques (Britz & Tracey, 1990).

III.1.2. Le degré d'alcool

La teneur en éthanol qui provient de la FA réalisée par les levures en amont de la FML varie de moins de 12 % (v/v), par exemple pour des vins de climat froid, à plus de 15 % pour des vins de climats les plus chauds, en raison des différences de teneurs initiales en sucres. Certaines souches sont capables de se développer à des teneurs en éthanol très élevées. Néanmoins, cette capacité de résistance à l'éthanol varie énormément entre les différentes souches d'*O. oeni* et

avec les autres paramètres physicochimiques du vin (Britz & Tracey, 1990). Le taux de croissance décroît de manière linéaire avec l'augmentation de la concentration en éthanol. Au-delà de 14 % (v/v) d'éthanol, la majorité des souches ont atteint leur maximum de tolérance (Davis et al., 1985). De plus, cette tolérance des souches à l'éthanol diminue avec l'augmentation de la température (Henick-Kling, 1993). Néanmoins, une teneur minimale de 6 % d'éthanol est optimum pour l'activité malolactique d'*O. oeni* (Guerzoni et al., 1995).

L'éthanol induit un changement de la composition de la membrane chez diverses espèces comme *L. hilgardii* (Couto et al., 1996) et *O. oeni* (Tracey & Britz, 1989). L'éthanol est un alcool aliphatique responsable de la fluidification des membranes par son insertion entre les têtes polaires des phospholipides de la membrane, allant jusqu'à provoquer une augmentation de la diffusion passive des protons H^+ à travers la membrane et une perte de contenu cellulaire (Da Silveira et al., 2002). Certains microorganismes sont capables de modifier la composition en acides gras de leur membrane afin de limiter cette fluidification et donc l'augmentation de la perméabilité membranaire (Dombek & Ingram, 1984). Chez *O. oeni*, la rigidité membranaire augmente en présence d'éthanol (Couto et al., 1996) (Tourdot-Maréchal et al., 2000). Une préacclimatation des cellules d'*O. oeni* en culture à 30 °C en présence de 8 % d'éthanol permet de diminuer la diffusion passive de protons et donc d'augmenter la tolérance à l'éthanol.

III.1.3. La température

La température est le paramètre qui, avec le pH, influence le plus la durée de la fermentation. Mais c'est également celui qui est le plus contrôlable lors de la vinification. Les activités enzymatiques de la cellule nécessaires pour son développement sont fortement influencées par la température. Lorsqu'une souche d'*O. oeni* est cultivée dans un milieu de culture en laboratoire, sa température optimale de croissance est de 25 à 30 °C. Dans le vin, en présence d'éthanol, la température optimale pour sa croissance et pour la réalisation de la FML est d'environ 20 °C. Au-delà de 25 °C, la FML peut être ralentie pouvant ainsi favoriser le risque de contamination par une autre espèce bactérienne. Lorsque la température du chai est inférieure à 18 °C, le temps de latence pour le démarrage de la FML augmente. La survie d'*O. oeni* et sa capacité à réaliser la FML peuvent être augmentées par un choc thermique (42 °C) (Guzzo et al., 1994).

III.1.4. Le dioxyde de soufre

Le dioxyde de soufre ou SO_2 est utilisé dans le vin comme antioxydant, inhibiteur d'activités enzymatiques, mais également comme agent de stabilisation microbiologique. L'ajout d'une quantité variable de SO_2 (50 – 100 mg/L de SO_2) peut s'effectuer à différents moments de la vinification allant de la vendange à la conservation du vin. Il faut cependant différencier le SO_2 libre et le SO_2 combiné dont les proportions sont principalement influencées par le pH et la composition du vin. L'effet du SO_2 est plus important lorsqu'il est sous forme libre, car il devient toxique pour la cellule. Sous forme combinée à des composés carbonylés, le SO_2 perd ses propriétés antimicrobiennes. Parmi le SO_2 libre, il existe différentes formes : le SO_2 moléculaire ($\text{H}_2\text{O SO}_2$), l'anion bisulfite (HSO_3^-) et l'ion sulfite (SO_3^{2-}). Seul le SO_2 moléculaire est capable de diffuser à travers la membrane, de s'accumuler dans le cytoplasme sous la forme SO_3^{2-} et de réagir avec les composés cellulaires comme les acides nucléiques ou certains cofacteurs (Romano & Suzzi, 1993), ce qui inhibe la croissance des bactéries lactiques (Carreté et al., 2002) et donc la FML (Henick-Kling, 1993). À un pH4, en solution modèle, l'augmentation de la concentration en SO_2 libre de 2 mg/L à 5 mg/L peut retarder la réalisation de la FML, passant de 2 à 45 jours (Carreté et al., 2002). À 20 mg/L de SO_2 libre, 50 % de l'activité ATPasique est inhibée chez plusieurs souches d'*O. oeni*. Une concentration de 100 mg/L de SO_2 total dans un vin ou 10-15 mg/L de SO_2 libre est suffisante pour inhiber la croissance des bactéries lactiques (Ribéreau-Gayon et al., 2012a) (Guzzo et al., 1998) même si l'effet de la concentration du SO_2 varie en fonction des souches.

Le pH du vin influence fortement la proportion de SO_2 moléculaire et donc son impact ; à traitement égal de SO_2 , plus le pH est bas, plus la mortalité des bactéries lactiques est importante (Fang & JP, 1993).

III.1.5. Les composés phénoliques

Le vin est une source majeure de polyphénols (Neveu et al., 2010) allant d'une concentration de 1,8 à 4 g/L en équivalent d'acide gallique (GAE) (Frankel et al., 1995). Les composés phénoliques du vin réunissent un mélange de différents types de composés plus ou moins complexes dont le nombre et la structure sont très variables. Leur rôle principal en œnologie est multiple : ils permettent d'apporter la couleur aux vins, de contribuer à leur aspect gustatif et participer à la stabilité colloïdale. Cependant, les polyphénols peuvent également avoir un effet sur les microorganismes du vin dont *O. oeni* pouvant alors perturber la FML. Leurs structures et impacts sur les bactéries du vin sont détaillés dans le paragraphe (III.2)

III.2. Les polyphénols du vin et leur action sur les microorganismes

III.2.1. Les différents polyphénols du vin

Les composés phénoliques du vin présentent une grande diversité de structures et sont divisés en deux grandes familles : les composés non-flavonoïdes provenant principalement de la pulpe du raisin et les composés flavonoïdes provenant des parties solides du raisin (pépins et pellicules).

III.2.1.1. Les composés non flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes regroupent dans le vin les acides-phénols (100-200 mg/L dans un vin rouge et 10-20 mg/L dans un vin blanc) et les stilbènes (20-80 mg/L dans le vin rouge) (Ribéreau-Gayon et al., 2012b).

Les acides-phénols sont divisés en deux sous groupes : les composés qui dérivent de l'acide benzoïque (acide gallique, salicylique, vanillique etc.) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (acide coumarique, caféique, férulique). La structure des deux types d'acides-phénols est différente, avec un squelette C_6-C_1 pour les acides benzoïques et C_6-C_3 pour les acides hydroxycinnamiques (Figure 13). Les différents dérivés de ces deux types de composés varient en fonction du type de chaîne latérale R_2 à R_5 (hydrogène, groupement hydroxyle et groupement méthoxylé).

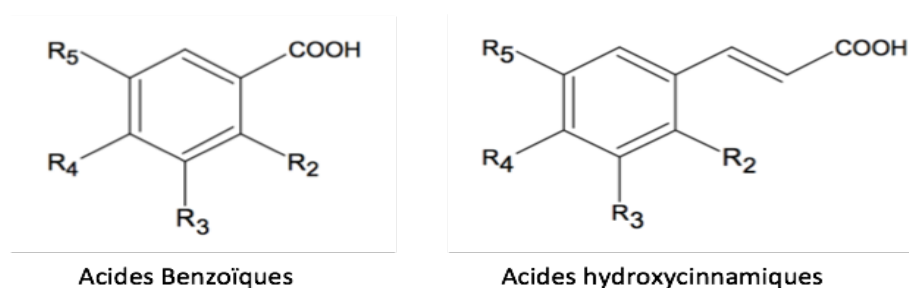


Figure 13: Structure chimique des acides-phénols.

Les stilbènes sont des composés avec une structure de base de type $C_6-C_2-C_6$. Leur structure varie ensuite en fonction de la position des fonctions hydroxyles, mais également en fonction de la conformation stérique et de la substitution par des sucres ou des résidus méthoxy. Le stilbène le plus connu est le resvératrol, qui est présent majoritairement dans le vin sous la forme *trans*-resvératrol -3-*O*-glucosides ou *trans*-picéide (Figure 14).

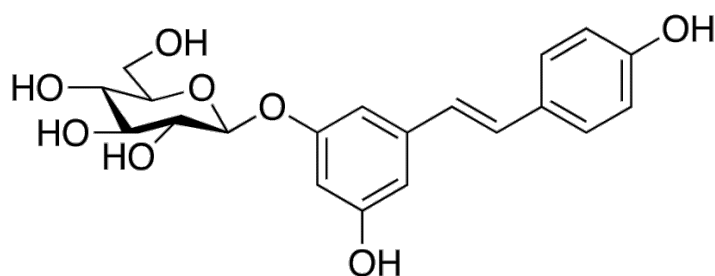


Figure 14: Structure chimique du *trans*-picéide.

III.2.1.2. Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes regroupent une large famille de molécules dont la structure de base est de type C₆-C₃-C₆ (Figure 15). Ces composés possèdent deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné : un cycle phlorogucinol (A), un cycle catéchol (B) et un cycle pyrane (C).

Il existe ainsi plusieurs sous-familles : les flavonols, flavones, flavanones, flavanonols, flavanols et anthocyanes dont les proportions dans le vin diffèrent. Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes et les flavane-3-ols (flavanols) sont particulièrement importants en œnologie quantitativement et qualitativement.

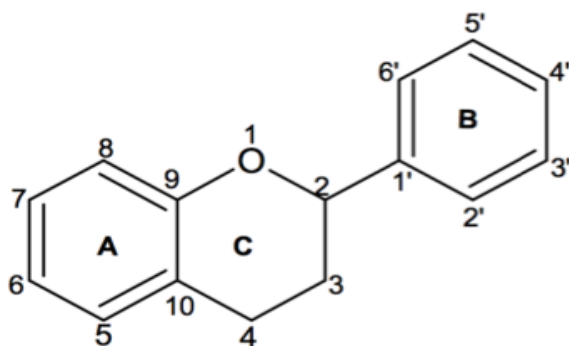


Figure 15: Structure chimique de base des composés flavonoïdes.

Parmi les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanonols, les flavonols sont les composés les plus répandus (jusqu'à 100 mg/L dans le vin rouge et entre 1 et 3 mg/L dans le vin blanc) (Ribéreau-Gayon et al., 2012b). Les quatre principaux composés du raisin sont le kaempférol, le quercétol, le myricétol et l'isorhamnétol permettant d'apporter des pigments jaunes. Les anthocyanes permettent l'apport de pigments rouge dans le vin (350 à 1500 mg/L dans les vins rouges). Elles sont extraites principalement lors de la macération pré-fermentaire et de la FA (Ortega-Regules & Romero-Cascales, 2006). Les anthocyanes du genre *Vitis vinifera* sont : le cyanidol, le delphinidol, le péonidol, le pétunidol et le malvidol, toutes avec un cation flavylum au

niveau du cycle C, de forme glycosylées ou aglycones (Figure 16). Les formes glycosylées (anthocyanes) sont beaucoup plus stables que les formes aglycones (anthocyanidines). La proportion de chaque anthocyan dépend du cépage (de Gaulejac et al., 2001), de la température (Mori et al., 2005), des conditions climatiques (Mori et al., 2007) et du stress hydrique (Koundouras et al., 2006).

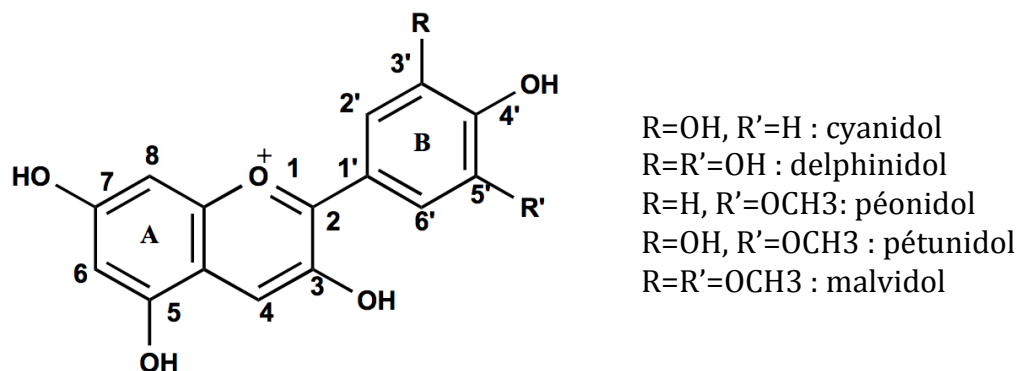
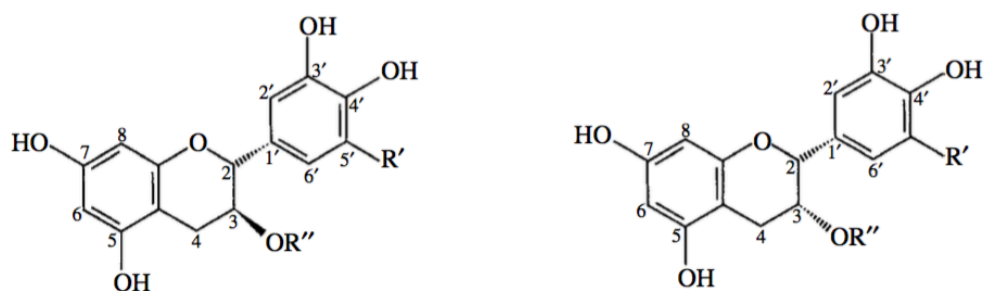


Figure 16: structure chimique des anthocyanidines du raisin.

Les flavan-3-ols et les tanins condensés (proanthocyanidines) sont les composés phénoliques les plus présents dans les vins (1-4 g/L dans les vins rouges et 100-300mg dans les vins blancs) (Ribéreau-Gayon et al., 2012b). Les tannins condensés sont des polymères d'unités flavan-3-ols dont la structure chimique suit celle des catéchines ou celle des épicatechines (Figure 17) reliés entre eux par une liaison interflavane C₄-C₈ ou C₄-C₆.



Série catéchine

Série épicatechine

$R'=H, R''=H$: (+)-catéchine

$R'=OH, R''=H$: gallocatéchine

$R'=H, R''=\text{acide gallique}$: catéchine galloylée

$R'=H, R''=H$: (+)-épicatechine

$R'=OH, R''=H$: épigallocatéchine

$R'=H, R''=\text{acide gallique}$: épicatechine galloylée

Figure 17: Structures chimiques des flavan -3-ols.

L'étude de la structure des tannins reste très difficile de par la très grande diversité du nombre et du type d'unités monomères, de leur conformation, ainsi que du type de liaison interflavane. Le nombre d'unités monomériques moyen d'un vin peut cependant être mesuré par le degré de polymérisation moyen (DPm). Les tanins condensés sont des molécules très instables en solution, ils sont donc capables d'interagir entre eux ou bien de former des liaisons stables avec des protéines ou des polysaccharides, formant ainsi une structure colloïdale (McManus et al., 1985).

III.2.2. L'action antimicrobienne des polyphénols

Les polyphénols, de par leur nature à former des liaisons avec des composés macromoléculaires, peuvent avoir un rôle antimicrobien, que se soit sur les bactéries lactiques ou sur d'autres bactéries, y compris des espèces pathogènes. Cependant, certains composés peuvent avoir une action stimulante sur la croissance de certaines espèces comme celles qui se développent dans le vin. Les effets des polyphénols sur les bactéries du vin sont donc variables en fonction des types de composés, de leurs concentrations ou des espèces bactériennes. De plus, compte tenu du pouvoir inhibiteur de certains composés phénoliques sur la croissance des bactéries lactiques, il est envisagé de les utiliser pour assurer la stabilisation microbiologique du vin, en remplacement du SO₂ (García-Ruiz et al., 2013).

III.2.2.1. Effet sur des bactéries pathogènes

Les polyphénols du vin sont très largement étudiés dans le domaine de la nutrition santé en ce qui concerne leur action sur certaines maladies comme les maladies cardiovasculaires (Frankel et al., 1993) (Teissedre et al., 1996) et dégénératives (Orgogozo et al., 1997) (Letenneur, 2007) ou les cancers (Renaud et al., 1999) dans le cas d'une consommation modérée de vin. Mais depuis quelques années l'effet des polyphénols du vin sur des bactéries pathogènes à Gram+ ou Gram- est de plus en plus étudié.

L'action antimicrobienne de vins issus de différents cépages comme le Malbec, le Cabernet Sauvignon et le Merlot, ainsi que de composés polyphénoliques purs a été testée sur des bactéries telles que *L. monocytogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* ou *P. aeruginosa* (Rodríguez Vaquero et al., 2007). Les auteurs ont observé que l'inhibition des microorganismes augmentait lorsque la concentration en polyphénols purs augmentait, avec une variabilité des effets en fonction du type de composés et de la bactérie. Par exemple *E. coli* est sensible à pratiquement tous les composés phénoliques purs testés (acide gallique, vanillique, quercétine,

catéchine etc.) tandis que *Flavobacterium sp* est très résistante. Cependant, les souches d'*E. coli* ATCC 35218 et ATCC 25922 sont beaucoup plus résistantes à l'effet des polyphénols, ce qui montre une très grande variabilité entre les souches et la capacité de résistance aux polyphénols même chez des bactéries pathogènes. De plus, tous les vins testés, des contrôles aux vins concentrés deux à quatre fois (d'environ 2,5 à 9,1 g/L de polyphénols totaux) ont montré un effet inhibiteur proportionnel à la concentration en polyphénols.

III.2.2.2. Effet sur les bactéries lactiques du vin

Dans le vin, les études de l'effet des composés phénoliques sur les bactéries lactiques bénéfiques ou d'altérations montrent une grande variabilité d'effet en fonction de la structure chimique du composé phénolique, de l'espèce et même de la souche étudiée (Tableau 2). Il n'y a donc pas de consensus sur les effets des polyphénols.

De manière empirique, les vinificateurs ont toujours rapporté la plus grande difficulté à la réalisation de la FML dans des vins riches en polyphénols. En 1983, des premiers travaux ont montré que les anthocyanes condensées et les acides-phénols tels que l'acide coumarique ont un effet inhibiteur sur les levures et les bactéries lactiques, alors que l'acide gallique, lui, apparaît plutôt comme un composé pouvant stimuler la croissance des microorganismes (Ribéreau-Gayon et al., 2012a). Cet effet stimulant de l'acide gallique sur la croissance d'*O. oeni* et *L. hilgardii* a ensuite été validé par de nombreux auteurs (Vivas et al., 1997) (Reguant et al., 2000) (Alberto et al., 2001) (Lombardi et al., 2012). La concentration en acide gallique des vins rouges est de l'ordre de 95 mg/L en moyenne, soit environ la concentration testée dans chacune de ces études (100 mg/L). Cependant, d'autres travaux réalisés en utilisant cette même concentration ont montré des résultats opposés, avec une inhibition de la croissance d'*O. oeni* et aucun effet sur celle de *L. hilgardii* (Campos et al., 2003). L'acide vanillique, un dérivé de l'acide benzoïque comme l'acide gallique, ne montre pas ou très peu d'effet sur la croissance d'*O. oeni* (Vivas et al., 1997) (Figueiredo et al., 2008).

D'autres acides-phénols, dérivés de l'acide cinnamique (acide caféique, férulique et p-coumarique), ne montrent pas d'effet sur *O. oeni* à faible concentration (25 mg/L), mais une inhibition à une concentration supérieure à celle retrouvée dans le vin rouge (100 mg/L) (Reguant et al., 2000) (Campos et al., 2003). Toutefois, il existe une grande variabilité des effets des acides-phénols sur la croissance et la réalisation des FML des souches d'*O. oeni* (Lombardi et al., 2012).

Tableau 2: Effet des polyphénols sur la viabilité et la FML des bactéries lactiques du vin.

Type de composés	Nom du composé	Nature de l'impact	Références
Acides hydroxybenzoïques	Acide gallique	Inhibition ou stimulation de la croissance de <i>L.hilgardii</i> et d' <i>O. oeni</i> et de la FML	(Lombardi et al., 2012) (Reguant et al., 2000) (Vivas et al., 1997) (Alberto et al., 2001) (Campos et al., 2003)
	Acide vanillique	Pas ou très légère inhibition de la survie	(Vivas et al., 1997) (Figueiredo et al., 2008)
Acides hydroxycinnamiques	Acides p-coumarique, caféique et férulique	Pas d'effet ou inhibition sur <i>L. hilgardii</i> , <i>P. pentosaceus</i> et <i>O. oeni</i> . Plus d'effet sur la croissance que sur la FML	(Reguant et al., 2000) (Campos et al., 2003) (Lombardi et al., 2012) (Garcia-Ruiz et al., 2009)
Flavonoïdes	Anthocyanes libres	Diminution de la phase de latence, activation de la croissance cellulaire, de la dégradation de l'acide malique et de l'acide citrique	(Vivas et al., 1997) (Rozès et al., 2003)
Flavonols	Quercétine Myricétine Kaempférol Morine	Aucun effet ou inhibition, stimulation de la croissance et de la FML sur <i>L. hilgardii</i> , <i>P. pentosaceus</i> et <i>O. oeni</i>	(Garcia-Ruiz et al., 2009) (García-Ruiz et al., 2011) (Figueiredo et al., 2008) (Reguant et al., 2000)
Monomère flavan-3-ols	Catéchine et épicatechine	Pas d'effet ou stimulation de la croissance et de la FML d' <i>O. oeni</i> et <i>L. hilgardii</i>	(Lombardi et al., 2012) (Alberto et al., 2001) (Reguant et al., 2000) (Figueiredo et al., 2008)
Polymère de flavan-3-ols	Tannins condensés	Fort impact sur la viabilité cellulaire même à faible concentration	(Vivas et al., 2000) (Figueiredo et al., 2008)

En ce qui concerne les composés flavonoïdes, les anthocyanes libres (extraites de pellicule de raisin de Cabernet Sauvignon et de la malvidin -3-monoglucoside pure) à une concentration de 200 mg/L, ont un effet stimulant sur la survie et la croissance d'*O. oeni* ainsi que sur la phase de latence et la durée de la FML (Vivas et al., 1997). Selon les auteurs, les cellules en croissance sont capables de métaboliser les anthocyanes libres, ce qui suggère l'excision du glucose lié aux anthocyanes et son utilisation comme source d'énergie grâce à l'enzyme β -glucosidase (Rozès & Peres, 1996) (Grimaldi & McLean, 2000). D'autre part, en plus d'une stimulation de la dégradation de l'acide malique, les anthocyanes, notamment la malvidine-3,5-diglucoside,

permettraient la stimulation de la dégradation de l'acide citrique à des concentrations de 50 et 150 mg/L (Rozès et al., 2003).

Les composés flavonols ont eux une grande diversité d'effets en fonction de leur structure (position des groupements hydroxyle), de l'espèce et des travaux réalisés. En effet, le kaempférol et la quercétine inhibent la croissance d'*O. oeni* de manière proportionnelle à l'augmentation de la concentration (0 à 40 mg/L), mais pas celle de *L. hilgardii* (Figueiredo et al., 2008). La myricétine n'a pas selon ces auteurs d'effet sur les deux espèces. Néanmoins, d'autres auteurs ont observé une légère stimulation de la croissance et une accélération de la dégradation de l'acide malique en présence de quercétine (5 à 100 mg/L) (Reguant et al., 2000). En outre, la concentration inhibitrice médiane IC₅₀ des flavonones varie de 0,160 à 0,854 g/L sur différentes souches d'*O. oeni*, *L. hilgardii* et *P. pentasocus* (García-Ruiz et al., 2011). Le kaempférol ne montre cependant aucun effet sur les souches d'*O. oeni* contrairement aux résultats de (Figueiredo et al., 2008). Les flavonones sont considérés comme étant les composés phénoliques ayant le plus fort pouvoir inhibiteur sur les bactéries lactiques du vin (Garcia-Ruiz et al., 2009) (García-Ruiz et al., 2011).

Pour les autres composés flavonoïdes, les monomères et polymères de flavan-3-ols (catéchine et épicatechine), ne semblent pas avoir d'effet sur *O. oeni* et *L. hilgardii* (Figueiredo et al., 2008), mais certaines études montrant un effet stimulant sur la croissance de ces bactéries et sur la réalisation de la FML, pour des concentrations variant de 25 à 500 mg/L (Reguant et al., 2000) (Alberto et al., 2001) (Lombardi et al., 2012). Néanmoins, les oligomères (extraits des pépins de raisin) ont un très fort pouvoir inhibiteur, qui est proportionnel à la taille des composés sur *O. oeni* (Figueiredo et al., 2008) et *L. hilgardii* (Vivas et al., 2000).

III.2.2.3. Mécanismes d'action des polyphénols sur les bactéries

Le mécanisme d'action des polyphénols sur les bactéries est encore mal connu. Certains auteurs ont donc proposé comme hypothèse d'action :

(i) Une adsorption des polyphénols à la cellule (Scalbert, 1991) pouvant endommager ou modifier la composition de la membrane (García-Ruiz et al., 2011). En effet, en présence d'acides-phénols, il a été montré une augmentation de l'entrée de protons et la sortie de potassium et de phosphate sur des cellules d'*O. oeni* et de *L. hilgardii* (Campos et al., 2009). D'autres auteurs ont observé des modifications de la composition lipidique de la membrane se traduisant par une augmentation de la fluidité (Rozès & Peres, 1998), en adéquation avec les travaux de (Hendrich, 2006). L'hypothèse du rôle des polysaccharides de la paroi dans la formation de liaisons hydrogènes avec les polyphénols a été avancée par (Vivas et al., 2000) en corrélation avec de précédents travaux (McManus et al., 1985) (Hemingway & Laks, 2012).

(ii) Un effet toxique de l'accumulation dans le cytoplasme de formes dissociées de certains polyphénols. La dissociation provoquant une acidification du cytoplasme ainsi qu'une possible interaction avec des protéines (Reguant et al., 2000) (Campos et al., 2003).

(iii) Un effet sur le système redox du milieu et de la cellule (Bossi et al., 2007). L'auto-oxydation des polyphénols en réponse à un environnement oxydatif entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène pouvant altérer la membrane plasmique (Hoshino et al., 1999).

(iv) Une modification des activités métaboliques : interaction avec des enzymes métaboliques (GAPDH et phosphate isomérase) et des protéines ribosomales (Bossi et al., 2007). La capacité des polyphénols à se lier avec les protéines est due à leur structure favorable à la formation de liaisons hydrogènes (McManus et al., 1985) (Hemingway & Laks, 2012) (Scalbert, 1991). Une augmentation de la taille des tannins (DPm élevé) a pour conséquence une augmentation des liaisons hydrogènes et donc de l'effet toxique. Les polyphénols peuvent également former des complexes avec des métaux ce qui pourrait appauvrir le milieu en éléments nécessaires à la croissance selon (Hemingway & Laks, 2012).

III.3. Mécanismes de résistance aux stress

En condition de stress, la cellule modifie son métabolisme pour mettre en place des mécanismes de résistance qui apparaissent de manière transitoire pour s'adapter aux conditions défavorables. En fonction du ou des stress auxquels elle est exposée, *O. oeni* peut mettre en place plusieurs systèmes de protection. De nombreux travaux ont été conduits depuis les années 1990 pour identifier ces systèmes. Les stratégies employées ont consisté à analyser le rôle et l'expression de quelques gènes d'intérêt, ou bien, plus récemment, la totalité des gènes exprimés par la cellule en employant des approches de séquençage haut débit des ARNs ou d'analyse des protéomes.

III.3.1. Activation de l'ATPase membranaire

La capacité à maintenir un gradient de protons transmembranaire via la régulation du pH intracellulaire (pH_{int}) est essentielle à la survie des bactéries exposées à un environnement acide, et en particulier pour *O. oeni* dans le vin. Pour cela, *O. oeni* dispose d'une ATPase membranaire de type (F_0F_1) H^+ -ATPase, qui a été caractérisée dès le début des années 1990 (Garbay & Lonvaud Funel, 1994) et qui joue un rôle central dans le maintien du pH_{int} à une valeur proche de 6 (Salema et al., 1994).

Dans le vin, la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-lactique n'est pas directement une source d'énergie pour la cellule, comme décrit précédemment, elle génère une force proton motrice qui permet le fonctionnement de l'ATPase et la synthèse d'ATP (Cox & Henick-Kling, 1989) (Salema et al., 1994).

Le fonctionnement de l'ATPase varie notamment en fonction du stade de croissance de la bactérie (Bouix & Ghorbal, 2015), avec un maximum d'activité ATPasique durant la phase de croissance (Carreté et al., 2002). De plus, son activité est réversible. L'ATPase permet soit l'entrée de protons avec une production d'ATP, soit la sortie de protons par l'hydrolyse d'ATP. Elle est donc impliquée dans la tolérance au stress acide. Chez *O. oeni*, une augmentation de l'activité du complexe (F_0F_1) H^+ -ATPase a été observée lors de sa croissance à pH 3,5 comparé à pH 5,3, ainsi qu'une sur-expression de l'ARNm d'une partie de l'opéron codant pour cette ATPase (Fortier et al., 2003). Des mutants déficients en activité ATPasique sont incapables de survivre à pH bas ou d'effectuer la FML (Tourdot-Maréchal et al., 1999) (Galland et al., 2003). Ces travaux ont par ailleurs montré l'absence de transcription de l'opéron malolactique chez ces mutants. Le lien entre l'activité ATPasique et le système malolactique semble cependant être spécifique aux bactéries acidophiles (Galland et al., 2003). Enfin, certains composés comme le SO_2 , les acides gras ou le cuivre peuvent réduire l'activité ATPasique et le taux croissance d'*O. oeni* et retarder ainsi la FML (Carreté et al., 2002). L'activité ATPasique peut donc être considérée comme un bon marqueur de l'état physiologique d'une cellule.

III.3.2. Activation des mécanismes en lien avec le système redox

Chez *O. oeni*, la présence d'oxygène n'est pas requise pour sa croissance de par son type énergétique anaérobie facultatif. La toxicité de l'oxygène chez les bactéries est généralement attribuée aux dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) constitués d'espèces chimiques oxygénées comme les radicaux libres ($OH\cdot$), les ions oxygénés (O_2^-) et les peroxydes (H_2O_2). Ces molécules attaquent les protéines, les lipides et les acides nucléiques et jouent un rôle central dans le vieillissement et la mort cellulaire. Les systèmes d'oxydoréduction (ou « redox ») mis en place par les bactéries pour limiter la toxicité des DRO impliquent de manière générale différents mécanismes enzymatiques de dégradation ou de piégeage de l'oxygène et des DRO, ainsi que la réparation et la prévention des dommages engendrés. Les mécanismes les plus importants jouent un rôle dans la réduction du milieu intracellulaire et sont principalement ceux de la thiorédoxine et du glutathion.

III.3.2.1. Le système redox de la thiorédoxine

Le système redox de la thiorédoxine est un des systèmes d'action des bactéries pour lutter contre le stress oxydatif. La thiorédoxine est une enzyme d'oxydoréduction avec un site actif hautement conservé (Cys-Gly-Pro-Cys) (Holmgren, 1985). La protéine contient deux résidus cystéine au niveau de ce site actif permettant de réduire un pont disulfure (R-S₂) sur une protéine cible par la réaction redox d'échange entre la forme dithiol-disulfide de la protéine Trx (Figure 18). Le pont disulfure S-S de la forme oxydée de la thiorédoxine est ensuite réduit par la NADPH et l'enzyme thiorédoxine réductase (TrxR).

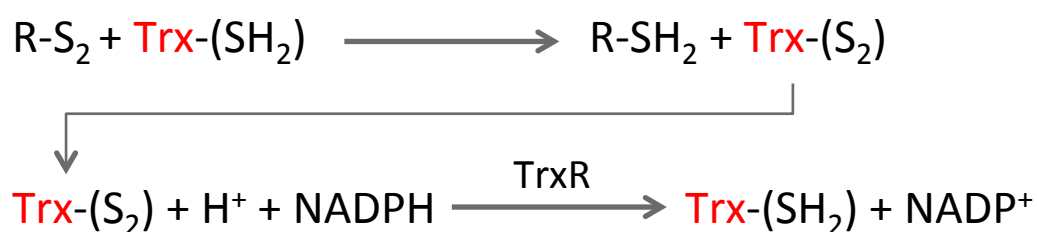


Figure 18: Mécanismes de la réaction antioxydante impliquant la thiorédoxine (Trx) et thiorédoxine réductase (TrxR).

L'étude du rôle de la thiorédoxine dans la réduction de nombreuses protéines a été largement décrit chez de nombreux microorganismes comme chez *E. coli*, de même que son rôle dans la synthèse d'ADN, la réparation de protéines et l'assimilation du soufre par sa capacité à donner un hydrogène (Zeller & Klug, 2006). Chez les bactéries lactiques, le système redox Trx/TrxR est présent avec toutefois une variation du nombre de gènes en fonction de l'espèce. Il permet la résistance au stress oxydatif associé avec l'induction d'autres gènes (Serrano et al., 2007). Chez *O. oeni*, le gène codant pour la thiorédoxine (*trxA*) a été identifié par (Jobin et al., 1999) et serait induit par la présence de peroxyde d'hydrogène ou par un choc thermique (Guzzo et al., 2000) permettant d'intégrer la protéine dans un système de régulation des mécanismes de résistance multiple (ATPase, ClpP protéase). Une préacclimatation dans un milieu de croissance riche, mais de pH bas (par exemple pH 3,5) induit une sur-expression du gène *trxA* durant la croissance dans ce milieu, après inoculation dans le vin (10 % d'éthanol, pH 3,5) et en fin de FML (Beltramo et al., 2006). L'augmentation du nombre de transcrits de *trxA* est associée à celle d'autres gènes codant pour des protéines de stress : Hsp18, ClpL1 et L2, GroES. De même, l'inoculation dans un vin modèle (12 % d'éthanol ; pH 3,4) augmente la synthèse de protéine impliquée dans la protection au stress oxydatif (deux protéines thiorédoxine TrxA et la thiorédoxine réductase

TrxB (Margalef-Català et al., 2016a). Enfin, TrxA peut également être induite chez *O. oeni* par la présence d'éthanol (8 % v/v) et participer à la résistance au stress (Costantini et al., 2015).

III.3.2.2. Le système redox du glutathion

Le système redox du glutathion est également un composant important de la réduction du milieu intracellulaire en réponse au stress oxydatif. Le glutathion, un composé thiolé importé est retrouvé de manière ubiquitaire chez les eucaryotes, assez largement chez les bactéries à Gram négatif, mais de manière plus sporadique chez les bactéries à Gram positif (Fahey et al., 1978).

Le glutathion est composé de trois acides aminés, le glutamate, la cystéine et la glycine (Glu-Cys-Gly), sous forme oxydée (GSSH) ou réduite (GSH). La réaction d'oxydoréduction du glutathion présentée en Figure 19 consiste tout d'abord en la réduction de peroxydes lipidiques ou d' H_2O_2 par la glutathion peroxydase associée à deux molécules de glutathion en une molécule d'eau, une molécule de glutathion oxydé (glutathion disulfide) et des dérivés de peroxydes sous forme d'alcool. Puis, l'action de la glutathion réductase associée au NADPH permet d'obtenir à nouveau du GSH.

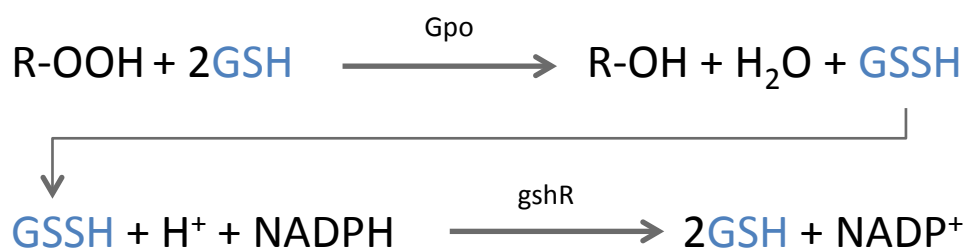


Figure 19: Mécanismes de la réaction antioxydante impliquant la glutathione peroxydase (Gpo) et la glutathione réductase (GshR).

Le glutathion est considéré comme un antioxydant pour sa capacité à réduire les DRO dans le milieu intracellulaire, mais également les ponts disulfures de certaines protéines permettant ainsi une alcalinisation du cytoplasme (Figure 20) (Pophaly et al., 2012).

Chez les procaryotes, l'entrée du glutathion dans la cellule est effectuée par un transporteur de type ATP binding cassette hétérodimérique composé de deux sous unités CydC et D. Chez les bactéries lactiques, le GSH importé par *L. lactis ssp. cremoris* SK11 permet d'améliorer la résistance au stress oxydatif appliqué par le peroxyde d'hydrogène (Li et al., 2003), ainsi qu'une protection lors d'un stress acide (pH 2,5 et 4) respectivement de courte et de longue durée (Zhang et al., 2007). De plus, certaines espèces de bactéries lactiques ont la capacité de produire

le GSH grâce à la présence de deux gènes *gshA* et *gshB* bien que cela puisse varier d'une souche à l'autre (Pophaly et al., 2012). Chez *O. oeni*, une analyse de 61 génomes a montré, l'absence des gènes de biosynthèse et de dégradation du GSH, mais la présence des gènes codant pour les enzymes Gpo et GshR (*gpo* et *gshR*) ainsi que les gènes pour le transport du GSH (*cydC* et *cydD*) (Margalef-Català et al., 2017). Les auteurs ont ainsi proposé des mécanismes d'action impliquant le GSH.

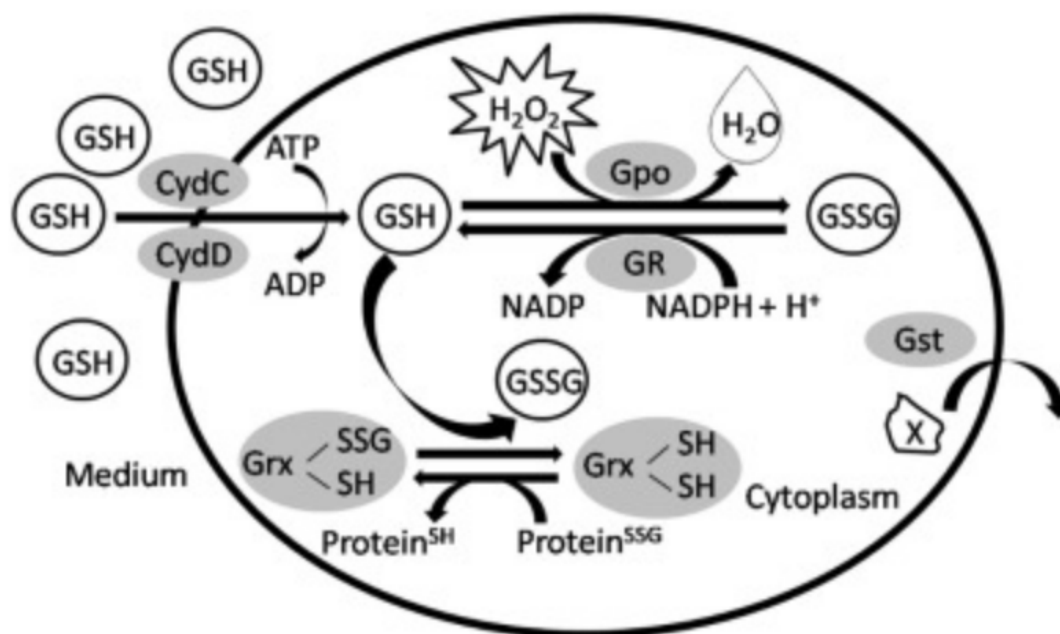


Figure 20: Mécanismes d'oxydoréduction impliquant le glutathion chez certaines souches d'*O. oeni* (Margalef-Català et al. 2017).

Légende : GR : glutathion réductase, Gpo : glutathion peroxydase, Grx glutaredoxine, CydC et D : sous unités du transporteur au GSH, Gst : glutathion S-transférase, X : substrat xénobiotique

Plusieurs études de protéomique réalisées sur *O. oeni* ont suggéré le rôle du système redox du glutathion dans la réponse au stress (Silveira et al., 2004) (Cecconi et al., 2009) (Margalef-Català et al., 2016a). Ainsi, des cellules d'*O. oeni* pré-acclimatées avec 8 % d'éthanol, puisensemencées dans le même milieu avec 12 % d'éthanol, produisent trois fois plus de GshR que des cellules non adaptées, ce qui selon les auteurs permettrait aux cellules de lutter contre les dommages liés au stress oxydatif induit par l'éthanol (Silveira et al., 2004). L'adaptation des cellules en présence d'éthanol (8 et 12 % v/v) pendant 24 h a également permis l'augmentation de l'expression du gène *gshR* (Costantini et al., 2015). De la même manière, une augmentation de l'abondance de GshR a été observée après inoculation de la souche *O. oeni* PSU1 dans un vin modèle (12 % d'éthanol, pH 3,4) (Margalef-Català et al., 2016a). Dans une autre étude sur le rôle

du glutathion en conditions de stress, les auteurs ont observé une augmentation de la survie des cellules en croissance en présence d'éthanol (14 % v/v) et de GSH, une augmentation des acides gras saturés et cyclopropanes durant la phase exponentielle de croissance ainsi qu'une augmentation de la biomasse lors de l'adaptation aux stress du vin suggérant une possible utilisation pour la production de levains industriels (Margalef-Català et al., 2016b). La stimulation de la présence de ces acides gras par le GSH permettrait donc de contrebalancer l'effet fluidifiant de l'éthanol.

III.3.3. Maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire

La paroi et la membrane bactérienne sont les premiers remparts aux stress environnementaux. C'est pourquoi certains microorganismes mettent en place des systèmes permettant le maintien de l'intégrité de leur paroi et de leur membrane, par exemple en modifiant leur fluidité membranaire (Swan & Watson, 1997) (Beney & Gervais, 2001). Néanmoins, si les conditions environnementales deviennent trop extrêmes les différentes régulations mises en place ne suffiront pas à compenser les changements survenus au niveau de la membrane.

III.3.3.1. Modification de la composition membranaire

La fluidité membranaire peut être décrite comme le mouvement des constituants de la membrane par rotation, diffusion latérale et flip flop des lipides. Cette fluidité peut être influencée par la composition en acides gras (plus les chaînes carbonées des acides gras sont longues et insaturées, plus la membrane est fluide (Denich et al., 2003)) et par la quantité de protéines membranaires (plus il y a de protéines plus la fluidité diminue). En présence de 10 % d'éthanol, *O. oeni* diminue son ratio acides gras insaturés/acides gras saturés (Garbay et al., 1995) et augmente le ratio protéines/lipides (Garbay & Funel, 1996) (Da Silveira et al., 2003). Une augmentation de la quantité de protéines et d'acides gras saturés permettrait de contrebalancer l'effet fluidifiant de l'éthanol en rigidifiant la membrane. Les enzymes nécessaires à la formation *de novo* d'acides gras sont codées par des gènes de l'opéron fab (fatty acid biosynthesis) (Lu & Rock, 2006). Le précurseur à la synthèse d'acides gras est l'acétyl-CoA qui va être dans un premier temps carboxylé afin d'initier la synthèse. L'élongation de l'acide gras va ensuite être poursuivie en fonction des besoins cellulaires par différentes enzymes (FabD, FabH, FabF, FabG, fabZ, fabK). De plus, selon (Teixeira et al., 2002) et (Grandvalet et al., 2008), lorsque *O. oeni* serait en présence d'éthanol ou d'un pH bas, la bactérie privilégierait la conversion de l'acide oléique insaturé à l'acide lactobacillique contenant un anneau

cyclopropane formé grâce à l'enzyme cyclo fatty acid synthase codée par le gène *cfa*. De même, il a été observé une augmentation des acides gras contenant un cycle propane, des acides gras à chaînes courtes et une diminution des acides gras insaturés en présence de 8 % d'éthanol (Maitre et al., 2014). La conversion de la forme *cis* vers la forme isomérique *trans* des acides oléique et palmitoléique a également été constatée par les auteurs ce qui pourrait contribuer à maintenir l'organisation lipidique de la membrane (Denich et al., 2003). Pour les autres types de stress, un choc acide (pH 3) engendrerait une rigidification de la membrane sans néanmoins modifier la viabilité cellulaire (Chu-Ky et al., 2005). Une diminution du pH de culture d'*O. oeni* de 4,8 à 3,2 permet d'enrichir la membrane en acide lactobacillique et de diminuer la quantité d'acide palmitique, ce qui permet d'améliorer la survie lors de la lyophilisation des souches industrielles (Hua et al., 2009).

En plus des changements de composition lipidique de la membrane plasmique, l'exposition à un stress peut induire la synthèse de protéines de stress qui s'associent aux lipides de la membrane et participent au maintien de la stabilité membranaire. La synthèse et le rôle des protéines de stress sont détaillés au paragraphe III.3.4. Les protéines de choc thermique (Hsp) sont produites chez les bactéries lorsque l'enveloppe cellulaire détecte des changements environnementaux. Chez d'autres genres bactériens, les Hsps comme DNaK et GroEL peuvent se lier à la membrane (Seydlová et al., 2012), ce qui en présence d'un stress acide permet la stabilisation de la membrane (Török et al., 1997). Chez *O. oeni*, la protéine Lo18 a été localisée au niveau de la membrane, où elle permet de moduler la fluidité des liposomes à de températures élevées (33,8 °C) (Coucheney et al., 2005b). De plus, la synthèse et la dimérisation de cette protéine, dans le cytoplasme d'*O. oeni*, en présence d'éthanol, stabilisent la membrane, tout en modifiant le type d'acides gras la composant (Maitre et al., 2014).

Les auteurs ont ainsi pu établir un modèle d'activité de Lo18 en réponse à l'éthanol présenté dans la Figure 21.

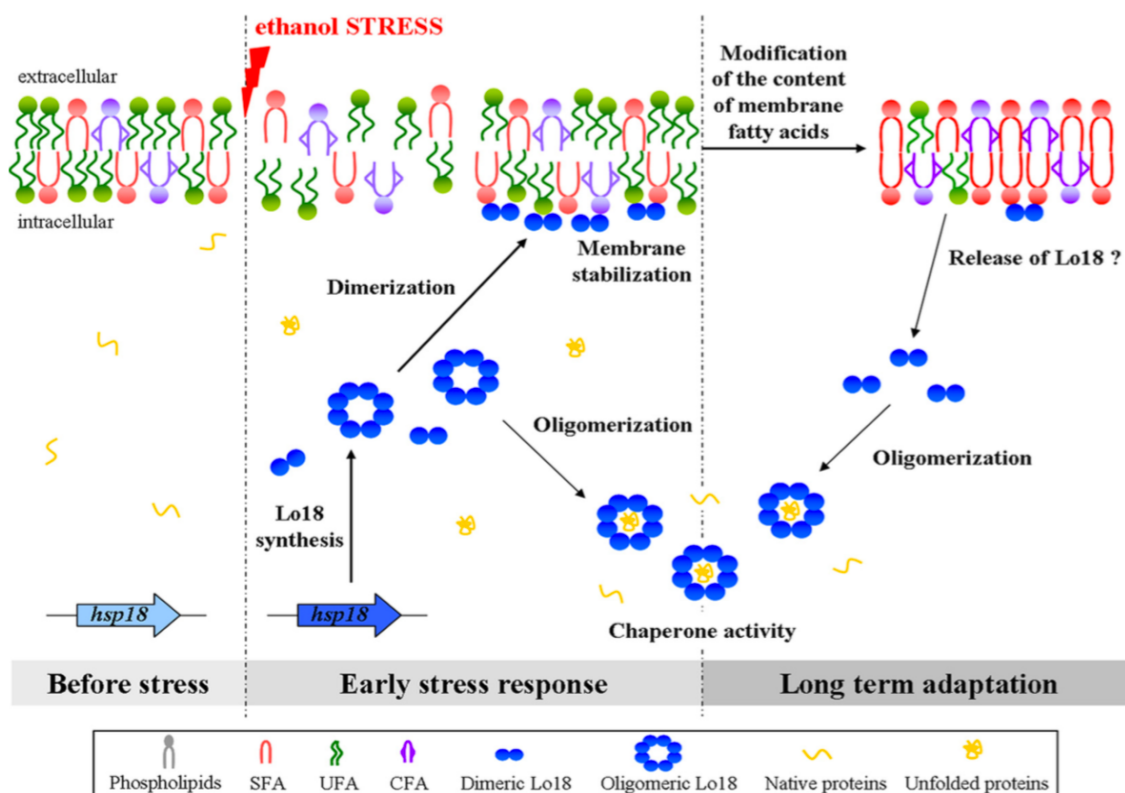


Figure 21: Modèle de l'activité de la protéine Lo18 chez *O. oeni* en réponse à la présence d'éthanol (Maitre et al., 2014).

III.3.3.2. Modification de la composition de la paroi

En réponse au stress, une modification de la composition de la paroi peut également être observée. L'analyse du protéome d'*O. oeni* par électrophorèse bidimensionnelle lors d'une préculture en présence d'éthanol (8 % v/v) montre une augmentation de la quantité de deux protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi, la dTDT-glucose-4,6-deshydratase et la D-alanine : D-alanine ligase (Silveira et al., 2004). De plus, une autre étude basée sur des données de transcriptomique et protéomique, sur l'effet des stress chez *O. oeni*, a également permis d'identifier des changements au niveau de la paroi (Margalef-Català et al., 2016a). Les auteurs ont constaté la sur-expression de plusieurs gènes et protéines impliqués dans la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire comme le gène codant pour D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase en présence de 12 % d'éthanol et d'un pH 3,4 dans un milieu modèle de vin. Cette protéine a été également identifiée chez *O. oeni* par d'autres auteurs, en présence de 8 et 12 % d'éthanol, avec d'autres protéines de la biosynthèse de la paroi (N-acétylmuramoy-L-alanine amidase, ADP glucose 6-deshydrogénase etc.) (Costantini et al., 2015). De plus, la glutamine fructose-6-phosphate transaminase était sur-exprimée chez des cellules d'*O. oeni* après préacclimatation pendant 24 h dans le vin et lyophilisation. Cette protéine est impliquée dans la synthèse de la N-

acétyle glucosamine, du peptidoglycane. Selon les auteurs, la nécessité pour la bactérie de surexprimer des gènes associés à la biosynthèse du peptidoglycane serait due selon à la pression exercée par l'éthanol, qui provoquerait des dommages engendrant ainsi le besoin d'une synthèse *de novo* des éléments constitutifs de la paroi (Costantini et al., 2015).

III.3.3.3. Production d'une capsule et d'EPS

La production d'EPS est un métabolisme associé à la croissance cellulaire d'*O. oeni* (Dimopoulou, 2013). De plus, lors de la présence de stress (éthanol, acidité, température), après 24 h d'incubation dans le milieu, il y a une stimulation des gènes *eps* indiquant qu'ils participent à l'adaptation de la cellule et non comme réponse immédiate aux stress (Dimopoulou, 2013). Parmi ces gènes, *dsrO* codant pour une dextrane-saccharase est celui dont l'expression est la plus modulée par les différents stress précédemment cités. La présence du gène fonctionnel *gtf* chez *O. oeni* et *P. parvulus* permettrait une résistance à l'acidité, à l'éthanol et au SO₂ ainsi que leur survie dans le vin blanc et le vin rouge (Dols-Lafargue et al., 2008). Les gènes *oeoe0071* et *oeoe1737* détectés par (Costantini et al., 2015) codant respectivement pour une protéine de biosynthèse d'EPS et l'UDP glucose 6-déshydrogénase ont elles été sur-exprimées en présence de 8 et 12 % d'éthanol ou seulement à 8 %. Pour les auteurs, ces résultats indiqueraient que la production d'EPS pourrait être un mécanisme de réponse à des conditions environnementales stressantes.

Pourtant, certains gènes (*wzd*) impliqués dans la formation d'EPS chez *O. oeni* peuvent néanmoins être inhibés ce qui pour les auteurs serait dû aux dommages causés par l'éthanol et le pH (Margalef-Català et al., 2016a).

III.3.4. Synthèse des protéines de stress

Chez les bactéries, la synthèse des protéines de réponse au stress également appelée Heat shock proteins (HSP) lors de conditions environnementales difficiles permet de limiter la dénaturation et l'agrégation de certaines protéines intracellulaires. Dans cette partie, seulement les protéines identifiées chez *O. oeni* seront abordées.

Les HSP sont classées et nommées en fonction de leurs poids moléculaires (kDa) et de leurs activités. Il existe donc trois grandes familles de HSP : les protéines chaperons moléculaires universels (HSP 60 : GroES, GroEL ; HSP70 : DnaK, DnaJ, GrpE), les protéines Clp (ClpC, ClpL1, ClpL2, ClpX) et les protéines de faible masse moléculaire (sHSP). Ces protéines hautement conservées génétiquement peuvent assurer diverses fonctions :

- Le repliement des protéines dans une conformation active
- La désagrégation des protéines endommagées par le stress
- La dégradation des protéines qui ne peuvent plus retourner à l'état natif

Une protéine dite « chaperon moléculaire universel » correspond à une famille de protéines qui permettent le repliement correct d'autres polypeptides, mais qui n'ont pas à proprement parler de rôle dans la structure fonctionnelle finale (Hendrick & Hartl, 1993). Elles ont donc la capacité de se lier aux protéines naissantes à la sortie des ribosomes pour leur permettre de prendre une configuration spatiale spécifique. Lors d'un stress, ces protéines vont s'associer avec des protéines ayant des liaisons inter- et intramoléculaires incorrectes et permettre leur repliement dans une conformation active. Parmi elles, on peut identifier les HSP 60 et HSP 70 qui reconnaissent les surfaces hydrophobes des peptides dépliés et par une série de mécanismes leur confèrent leur forme active. Les HSP 60, GroEL et son co-chaperon GroES vont s'associer avec des polypeptides de taille comprise entre 20 et 60 kDa, tandis que les HSP 70, DnaK et ses deux co-chaperons DnaJ et GrpE vont réagir avec des polypeptides de taille supérieure à 60 kDa (Hendrick & Hartl, 1993).

Les protéines Clp ou Caseinolytic proteins sont des régulateurs de la réponse au stress. Cinq protéines ont été identifiées dans le génome d'*O. oeni* : une protéine de type protéase à sérine ClpP et quatre protéines de type ATPase, la ClpC, ClpL1, ClpL2, et ClpX. Les protéines Clp type ATPase peuvent replier un substrat par consommation d'ATP et former une protéine native tandis que le complexe Clp ATPase/Clp protéase permet la dégradation irréversible de protéines dénaturées par consommation d'ATP en protéine dégradée (Corrieu & Luquet, 2008).

Enfin, les sHSP sont le dernier type de protéines de réponse aux stress. Les sHSP ont la capacité de former des oligomères à la fonction de chaperon moléculaire protégeant ainsi les polypeptides de l'agrégation.

Le gène *hsp18* code pour la protéine de stress Lo18 et a été identifié pour la première fois chez *O. oeni* exposée à une température de 42 °C et à un pH acide (pH 3) par (Guzzo et al., 1994).

La régulation de la synthèse de ces familles de protéines de stress est assurée chez *O. oeni* majoritairement par le répresseur CtsR (Derré et al., 1999) (Grandvalet et al., 2005). Cependant, un autre régulateur (HrcA) a été identifié chez *O. oeni* et sur-exprimé lors d'un stress (éthanol 8 %) bien que son rôle ne soit pas encore entièrement compris (Costantini et al., 2015).

Chez *O. oeni*, toutes ces protéines peuvent être induites par différents stress, être associées ou non à des changements physiologiques de la cellule (composition lipidique et stabilisation de la membrane) (Coucheney et al., 2005a) (Maitre et al., 2014) et selon diverses études protéomiques et transcriptomiques, ces protéines seraient le point central de la réponse au

stress (Costantini et al., 2015) (Margalef-Català et al., 2016a). Une quantité variable de protéines de réponse aux stress sont activées en fonction des conditions environnementales (température élevée, pH acide, éthanol 8-12 %, SO₂), de la souche utilisée, ou de l'état physiologique des cellules (par exemple organisées en biofilm ou sous forme planctonique). En effet, il a été montré que l'inoculation de biofilms d'*O. oeni* dans le vin induit une sur-expression de gènes codants pour des protéines de réponse aux stress tels que *clpL1*, *groEL*, *groES* et *hsp18* (Bastard et al., 2016). Cependant, il existe une temporalité d'expression des gènes codants pour la synthèse de protéines de réponse au stress variant par exemple de la sur-expression à la non-expression en fonction du moment de la FML (Beltramo et al., 2006).

Matériels et méthodes

I. Matériels biologiques

Différents types de souches d'*Oenococcus oeni* ont été utilisées durant cette thèse. Les caractéristiques des souches sont répertoriées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des souches utilisées durant cette étude

Nom de la souche	Type de collection	Origine géographique	Type de matrice
LAB06	Lallemand®	Italie	Vin rouge
LAD1	Lallemand®	Bourgogne	Vin blanc
LAA1	Lallemand®	Bordeaux	Vin blanc
LAL01	Lallemand®	Languedoc	Vin blanc
LAB2013	Lallemand®	Provence	Vin rosé
LACHT18	Lallemand®	Champagne	Vin blanc
14 195	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin blanc
14 196	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin blanc
14 198	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin blanc
14 202	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin blanc
14 203	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin blanc
14 206	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin rouge
14 208	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin rouge
14 210	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin rouge
14 213	CRB ŒNO	Bourgogne	Vin rouge
14 214	CRB ŒNO	Val de Loire	Vin rouge
14 217	CRB ŒNO	Bretagne	Cidre

Les souches d'origine industrielle (LALLEMAND®) ont été utilisées sous forme lyophilisée, standardisée à un niveau de population ou en version liquide : LAB06, LAD1, LAA1, LAL01, LAB2013 et LACHT18.

En ce qui concerne le choix des souches issues du centre de ressources biologiques œnologique (CRBO ŒNO) celles-ci ont été principalement isolées de vins blancs et des vins rouges de Bourgogne. Certaines d'entre elles ont montré des phénotypes spécifiques et différents en terme de résistance au pH et à l'éthanol permettant de les relier à leur matrice d'origine. Il s'agit des CRB ŒNO 14 196, 14 198, 14 202, 14 203 pour les souches de blanc et des CRB ŒNO 14 206, 14 210, 14 213, 14 214 pour les souches de rouge ainsi que la souche CRB ŒNO 14 217 isolée du cidre.

II. Vins utilisés lors des essais

Les caractéristiques analytiques des vins utilisés pour les différentes expérimentations sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètres analytiques des vins utilisés.

Vin	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
Millésime	2013	2015	2015	2013	2014
Cépage	Chardonnay	Chardonnay	Pinot noir	Cabernet sauvignon	Gamay
Éthanol (% v/v)	12,7	12,55	12,6	12,0	12,55
pH ajusté	3,58	3,48	3,60	3,48	3,5
L-malique (g/L)	3,4	3,5	1,5	2,3	2,4
Acidité volatile (g/L)	0,28	0,25	0,30	0,19	0,3
Acidité totale (g/L H₂SO₄)	4,3	4,59	3,05	4,01	4,57
SO₂ libre (mg/L)	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
SO₂ total (mg/L)	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ	<LDQ
DPm	/	/	3,5	3,23	3,8
Tannins totaux (g/L)	0,116±0,004	0,110±0,002	1,37±0,06	1,83±0,23	1,53±0,10
Tannins C	0,04±0,01	0,02±0,01	19,4±0,39	23,17±1,35	21,40±0,92
moléculaire EC	0,05±0,01	0,04±0,01	17,4±0,26	11,53±0,5	12,36±0,07
(mg/L)^a B1	nd	nd	1,2±0,06	0,98±0,21	2,80±0,04
B2	nd	nd	1,9±0,06	8,46±0,10	15,71±0,23
B3	nd	nd	5,3±0,03	6,50±0,17	2,98±0,05
B4	nd	nd	3,3±0,06	1,99±0,05	3,05±0,03
TOTAL (mg/L)	0,09±0,02	0,06±0,02	48,5±1,05	53,48±2,61	60,83±1,44
Total anthocyanes (mg/L)	nd	nd	145,2±8,4	60,34±4,51	150,8±9,6

^a C, (+)-catéchine ; EC, (-)-épicatechine ; B1-B4, procyanidine dimers (B1, B2, B3, B4)

nd : non détecté et <LDQ : inférieur à la limite de détection et de quantification

III. Conditions de culture

Toutes les souches ont été cultivées dans un milieu jus de raisin liquide contenant 250 ml/L de jus de raisin rouge commercial (Jaffaden, E.Leclerc®), 5 g/L d'extrait de levures, 1 ml/L de Tween80, eau distillée quantité suffisante pour (qsp) 1 L ajusté à pH 4 à l'aide d'hydroxyde de potassium puis stérilisé à l'autoclave 15 min à 121 °C. Les milieux ainsi obtenus sont inoculés puis incubés à 25 °C. Les cellules sont récoltées au milieu de leur phase exponentielle de croissance. Le niveau de population a été contrôlé par épifluorescence.

Les souches industrielles lyophilisées ont été préparées juste avant l'ensemencement selon le protocole industriel MBR® consistant en une réhydratation de 111 mg de lyophilisat dans 10 ml d'une eau non chlorée, 15 min à 20 °C. Cette préparation correspond à une population fixe de 2.10^8 cellules/ml grâce à la standardisation des levains.

Des croissances bactériennes ont été effectuées pour les souches provenant du CRB OENO et appartenant aux groupes VB et VR. Celles-ci ont été effectuées dans un moût rouge composé de 250 ml/L de jus de raisin rouge commercial (Jaffaden, E.Leclerc®), 5 g/L d'extrait de levure, 1 ml/L de Tween80®, eau distillée qsp 1 L, ajusté au pH nécessaire (2,8 ; 3 ; 3,3 ; 3,6 ; 4) et autoclavé. Les différentes souches testées ont été ensemencées en triplicata à une concentration cellulaire de 1.10^2 cellules/ml à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance. Le suivi de la croissance a été effectué par un dénombrement en goutte sur boîte de pétri avec milieu jus de raisin solide supplémenté de pimarinine comme décrit dans le Paragraphe III.1.

IV. Mesure de la croissance bactérienne

IV.1. Dénombrement des colonies sur milieu solide

La survie des souches a été mesurée par un dénombrement « en goutte » (Figure 22). Des dilutions décimales successives ont été effectuées en eau physiologique (Chlorure de Sodium NaCl 9 g/L) et deux fois 10 µL de chaque dilution décimale ont été déposés sur une boîte de pétri contenant du milieu jus de raisin solide (250 ml/L de jus de raisin rouge commercial [Jaffaden, E.Leclerc®], 5 g/L d'extrait de levures, 20 g/L Agar, 1 ml/L de Tween80®, eau distillée qsp 1L, ajusté à pH 4,8 et autoclavé). Après stérilisation, le milieu jus de raisin a été préalablement additionné de pimarinine à une concentration finale de 0,1 mg/ml afin d'inhiber la croissance des levures. Une fois les dépôts d'échantillons déposés et séchés, les boîtes de pétri ont été incubées à 25 °C durant une période allant de 7 jours à 14 jours selon les souches. Les unités formant colonies (UFC) ont ensuite été comptées sur les dilutions contenant entre 10 et 100 colonies.

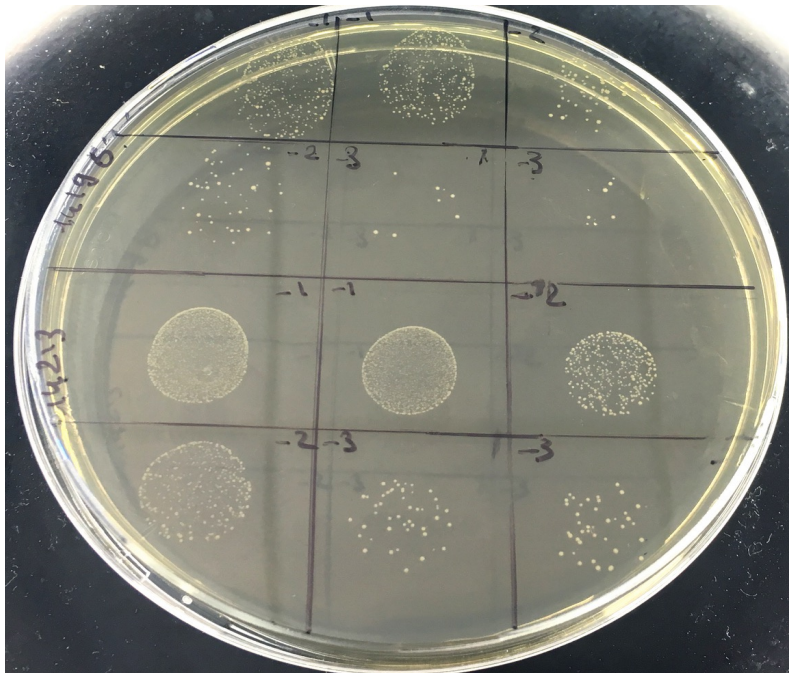


Figure 22 : Dénombrement « en goutte » de deux souches de Bourgogne.

IV.2. Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence

Le niveau de population des souches en culture a été mesuré par épifluorescence afin d'ensemencer les échantillons à une concentration donnée de 2×10^6 cellules/ml. Cette technique est basée sur la dégradation du substrat (l'acétate de fluorescéine) par une estérase intracellulaire des cellules viables en un fluorochrome appelé la fluorescéine. La fluorescence émise par cette molécule permet ainsi de dénombrer exclusivement les cellules vivantes à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

100 μ L d'un échantillon ou d'une dilution avec une population estimée à 10^6 cellules/ml a été filtré sur une membrane avec une porosité de 0,4 μ m (Chemunex®) à l'aide d'une pompe à vide. Cette membrane a été ensuite incubée 30 min à 30 °C à l'obscurité totale sur un disque de cellulose imbibé d'une solution de marquage (1 réaction = 500 μ L de tampon Chemsol B16 et 2,5 μ L de substrat chemChrome V6). Après incubation, la membrane a été placée entre lame et lamelle et observée au microscope à épifluorescence (Olympus BX51) selon les conditions d'observation spécifiques à ce matériel. Les cellules contenues entre 10 et 20 champs ont été comptées puis la moyenne a été multipliée au nombre de champs que contient la membrane et au facteur de dilution permettant d'obtenir la concentration cellulaire de l'échantillon.

V. Fermentations malolactiques

Les fermentations malolactiques pour l'analyse des ARN totaux ont été effectuées à l'université de Rovira i Virgili à Tarragone en Espagne sur un vin blanc de cépage Parellada millésime 2014 dès la fin de la fermentation alcoolique. Les principales caractéristiques du vin sont un pH de 3,5, 12 % d'alcool et 2 g/L d'acide L-malique.

La stabilité microbiologique du vin a été effectuée par ajout de Velcorin® également appelé dicarbonate de diméthyle à une concentration de 1 ml/L de vin, puis après une bonne homogénéisation, le vin a été laissé au repos pendant 24 h à 4 °C.

Le Velcorin® permet une inactivation de certaines enzymes vitales pour les microorganismes comme l'acétate kinase et la glutamate décarboxylase bien que la totalité de son mode d'action reste encore peu compris. La présence de microorganismes indigènes a été contrôlée avant le lancement des FML et aucune levure et bactérie lactique n'a été détectée.

Les souches LAA1 et LAD1 en version lyophilisées ont été ensemencées à 2.10^6 cellules/ml dans 250 ml de vin précédemment décrits dans 3 modalités différentes (0 ; 2,5 et 5 g/L de T1) avec 4 répliques biologiques. Un contrôle non ensemencé a également été effectué. Les échantillons ont été incubés à 20 °C durant tout le processus de FML. Le suivi de fermentation a été effectué par dosage de l'acide malique sur un analyseur chimique automatique (Miura one, TDI SL) et par mesure de la viabilité par dénombrement sur boîte de pétri. Les échantillons pour les extractions d'ARN ont été prélevés (20 ml) 1 h après l'ensemencement, 24 h et à mi-fermentation (environ 1 g/L d'acide malique).

Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 8000 g pendant 10 min puis 20 ml de la solution de lavage suivante (0,15 M NaCl ; 0,1 M EDTA ; 2% de polyvinylpyrrolidone (PVP)) maintenue à 4 °C dans la glace a été ajouté sur le culot cellulaire et les cellules ont été remises en suspension avant d'être à nouveau centrifugés. Le surnageant a été éliminé et 1 ml de la solution de lavage a été ajouté et les échantillons ont été transvasés dans un tube eppendorf RNA free et centrifugé à 15 000 g pendant 7 min. Les tubes eppendorfs contenant les culots cellulaires obtenus ont ensuite été placés dans l'azote liquide et stockés à -80 °C avant extraction de l'ARN.

Les FML effectuées sur les souches commerciales Lallemand® ont été effectuées dans le vin rouge VR2 (Tableau 4). Les souches lyophilisées LACHT18, LAD1 et LAB6 ont été ensemencées à 2.10^6 cellules/ml selon le protocole industriel MBR® dans 50 ml de vin additionné de 0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 g/L d'extrait polyphénolique T1. Un témoin non ensemencé a été effectué et chaque condition a été effectuée en duplicata. Le suivi de fermentation a été effectué par dosage enzymatique de l'acide L-malique (Boehringer, ROCHE®) et par mesure de la viabilité par dénombrement sur boîte de pétri.

VI. Tests phénotypiques

VI.1. Matrices testées

Les tests phénotypiques ont été effectués dans différentes matrices : premièrement, un moût blanc composé de 250 mL/L de jus de raisin blanc commercial (Jus de raisin blanc Bio, Moulin de Valdonne), 5 g/L d'extraits de levure, 1 mL/L de Tween80®, eau distillée qsp 1 L et de 6 % d'éthanol v/v. À partir de ce milieu, le pH a été ajusté de manière différente selon le test (pH 2,8 à 4), ou des extraits polyphénoliques ont été ajoutés à des concentrations variables (1 ; 2,5 et 5 g/L). De la même manière, d'autres matrices ont ensuite été testées : un vin blanc et un vin rouge et leur composition sont décrits dans le Tableau 4. Les vins utilisés pour chaque test phénotypique seront spécifiés dans la partie résultat correspondante. La stabilité microbiologique des vins a été effectuée avec du Velcorin® de la manière décrite dans le paragraphe IV.

VI.2. Conditions de stress

La survie des souches a été testée dans différentes conditions de stress : (i) le stress à l'acidité (pH 2,8 ; 3,0 ; 3,3 ; 3,6 et 4,0) ; (ii) le stress aux polyphénols à la composition différentes: T1, T2 et T3 (Tableau 5) pour différentes concentrations (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 g/L). Les extraits polyphénoliques testés sont d'origine commerciale.

Le pH a été ajusté avec solution d'acide orthophosphorique H_3PO_4 à 85 % ou d'hydroxyde de potassium (KOH) 10 N et mesuré au pH-mètre préalablement étalonné à pH 4 et pH 7.

Chaque condition de stress a été testée dans les différentes matrices (moût blanc, vin blanc et vin rouge) dans un volume de 10 ml en duplicata pour les vins et en triplicata pour le moût. Les échantillons des tests phénotypiques ont étéensemencés avec les différentes souches d'*O. oeni* à une concentration finale de 2×10^6 cellules/ml (T0 théorique). La population a été contrôlée immédiatement après ensemencement par dénombrement sur boîte correspondant au T0 réel. Les échantillons ont été placés à 20 °C pour les vins et à 25 °C pour le moût.

Puis après 48 h, 7 jours ou 14 jours, la population a été à nouveau contrôlée par dénombrement sur boîte afin de déterminer le pourcentage de population présente.

Tableau 5 : Composition des extraits polyphénoliques.

		T1	T2	T3
		Fraction Anthocyane	Fraction monomère	Fraction oligomère
Dpm		2,5	1,1	4,5
Tannins totaux (mg/g)		822,0±26,8	732,2±12,0	1000,0 ± 64,3
Tannins	C	20,7±0,5	144,1±2,0	7,6 ± 0,2
moléculaires	EC	19,0±0,6	129,6±3,4	12,9 ± 0,3
(mg/g)^a	B1	19,3±1,6	2,6±0,1	1,6 ± 0,1
	B2	14,1±0,6	2,9±0,1	7,3 ± 0,3
	B3	4,9±0,4	4,0±0,2	0,9 ± 0,1
	B4	5,3±0,8	2,0±0,6	2,1 ± 0,0
TOTAL (mg/g)		80,8±4,5	285,2±3,4	32,4 ± 1,0
Total anthocyanes (%)		10	<i>nd</i>	<i>nd</i>

Légende Tableau 5 : ^a**C**, (+)-catéchine ; **EC**, (-)-épicatéchine ; **B1-B4**, procyanidine dimers (B1, B2, B3, B4), *nd* : non détecté

VII.Observations microscopiques

VII.1.Préparation des cellules

Les différentes souches testées ont étéensemencées avec une culture bactérienne en phase exponentielle à 2.10⁶ cellules/ml dans différentes matrices (vin rouge, vin blanc, milieux modèles). Les cellules ont été récupérées après 7 jours de contact dans les milieux testés par centrifugation (10 000 g, 10 min).

Après élimination du surnageant, une première fixation chimique a été effectuée avec l'ajout de 10 ml de fixateur (Glutaraldéhyde 2 % dans du tampon Cacodylate 0,1 M pH7,2) sur le culot cellulaire. Les cellules ont été remises en suspension et la fixation a été réalisée durant 3 h à température ambiante puis les échantillons ont pu être stockés à 4 °C avant analyse. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 3 min à 8000 g et rincées trois fois avec 1 ml de tampon Cacodylate 0,1 M pH 7,2. De l'agarose 1 % a ensuite été déposé sur les culots et les cellules ont été remises en suspension. L'inclusion a été effectuée à 4 °C durant 10 à 15 min. Les blocs ont été ensuite découpés et introduits dans des puits remplis d'eau jusqu'à l'étape de post-fixation.

VII.2. Fixation des cellules

Une fois l'eau retirée, la solution de fixation a été ajoutée (1 % d'acide osmique OsO_4 – 1,5 % cyanoferrate de potassium $\text{C}_6\text{FeK}_3\text{N}_6$) et incubée avec le bloc d'agarose 1 h à température ambiante dans l'obscurité. Puis les blocs ont été lavés trois fois à l'eau pendant 5 min.

Une coloration sur bloc a ensuite été effectuée par ajout de 1 ml d'acétate d'Uranyle 3 % filtré pendant 45 min à 4 °C et à l'obscurité. Puis, les blocs ont été lavés trois fois avec de l'eau pendant 5 min. Les blocs ont été déshydratés par ajout d'éthanol (EtOH) au degré croissant (EtOH 50° 10min, EtOH 70° 10min, EtOH 95° 2x15min, EtOH 100° 2x20min) puis de l'oxyde de propylène a été ajouté et incubé pendant 30 min, deux fois avec les bouchons fermés afin d'éviter l'évaporation.

VII.3. Imprégnation et inclusion

De la résine époxy pure a été préparée en mélangeant 22,5 g de résine Epon avec deux durcisseurs des époxy : 18 g de Dodécényl succinique anhydrique (DDSA) et 9 g de méthyle-Nadic anhydrique (MNA) avec un accélérateur des époxys, le Benzyldiméthylamine (BDMA) : 1,350 ml et laissée reposer 15 min avant utilisation. Les blocs ont ensuite été incubés deux heures dans un mélange composé de 50 % de résine et 50 % d'oxyde de propylène à température ambiante avec couvercle ouvert afin de faciliter l'imprégnation de la résine. Puis, le bain a été changé et de la résine pure a été ajoutée dans le but d'être incubée pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, le bain de résine a été changé à nouveau et les blocs ont été mis à imprégner pendant cinq heures. Les échantillons ont ensuite été inclus dans des moules en silicone afin d'être polymérisés à 60 °C pendant 48 h.

VII.4. Coupes et observation

Un bloc de chaque condition a été coupé (4 grilles) sur un ultramicrotome LEICA® EM UCT avec un couteau diamant DIATOME®. Les coupes sont réalisées à 1 mm/s et 60 nm d'épaisseur puis déposées sur des grilles de cuivre 150 mesh pour l'observation au MET classique ou sur grille d'or 200 mesh pour l'observation au MET avec contraste de Thiery. Les coupes déposées sur grille ont ensuite été contrastées sur goutte d'uranyl less (Chromalys®) pendant 2 min, puis rincées deux fois sur goutte d'eau pendant 2 min. Les grilles ont ensuite été observées sur un microscope électronique à transmission HITACHI® H7650, en mode haut contraste.

VII.5. Contraste de Thiery

Un contraste supplémentaire peut être effectué dans le but d'observer les polysaccharides présents dans l'échantillon en ciblant les fonctions alcools vicinaux (Dimopoulou et al., 2014; Thiery, 1967). Les coupes ont été plongées dans l'acide périodique 1 % pendant 20 min et lavé deux fois rapidement puis trois fois 10 min à l'eau distillée. Du thiocarbohydrazide 0,2 % dans de l'acide acétique 20 % a été ensuite ajouté pendant 30 min à température ambiante à l'obscurité. Deux lavages rapides à l'acide acétique 10 %, puis deux lavages de 15 min suivis de trois lavages à l'eau de 20 min ont été réalisés. Enfin, un bain avec du protéinate d'argent à 1 % a été effectué pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité puis lavé trois fois à l'eau distillée.

Cette oxydation par l'acide périodique ouvre les liaisons entre deux carbones voisins présentant des fonctions alcools au niveau des chaînes de polysaccharides comme le montre la Figure 23 en ce qui concerne un polysaccharide typique de la paroi cellulaire, la cellulose. Une fois ses liaisons ouvertes, l'acide périodique les transforme en fonctions aldéhydes, puis le thiocarbohydrazide réagit avec les fonctions aldéhydes et enfin le protéinate d'argent est réduit en argent métallique opaque aux électrons au niveau des polysaccharides comportant ces fonctions alcools vicinaux.

Divers contrôles peuvent être effectués, notamment l'omission de certains réactifs comme le thiocarbohydrazide afin de confirmer la spécificité de la réaction pour les polysaccharides.

Les coupes contrastées par la méthode de Thiery ont été observées au MET HITACHI® H7650, en mode haut contraste.

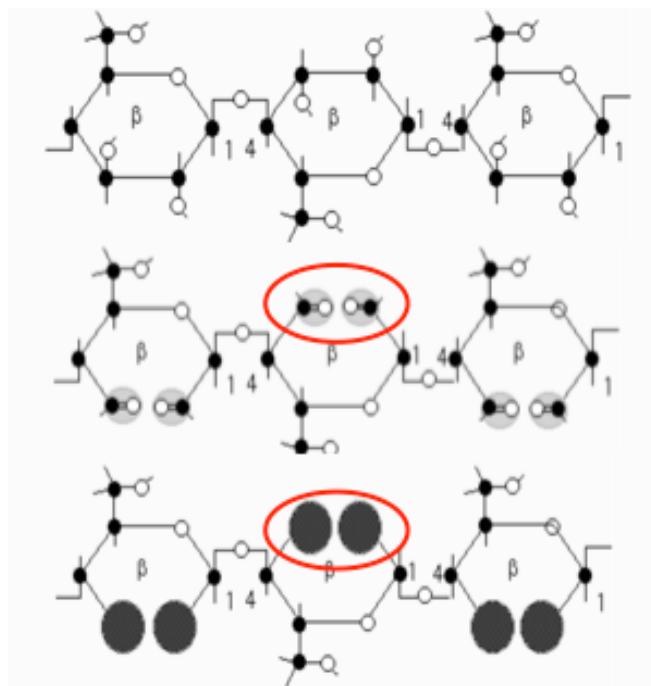


Figure 23 : Schéma du mode d'action de la réaction de Thiery sur la cellulose.

[http : //www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cytochimie.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cytochimie.htm)

VII.6. Coloration négative

La coloration négative est utilisée en microscopie afin d'observer un objet, dans notre cas les bactéries, de manière rapide et sans traitement lourd de l'échantillon. L'observation s'effectue non pas par coloration de l'objet (coloration positive), mais par coloration de l'environnement adjacent à la bactérie. La bactérie est alors visible par simple contraste entre le fond contenant les atomes de métaux lourds et la cellule. Cette technique a pour avantage, un gain de temps dans le traitement et l'observation des échantillons et d'éviter la manipulation des bactéries (centrifugation) qui peut provoquer dans certains cas des modifications de la structure biologique.

Les souches VB et VR de Bourgogne ont étéensemencées dans un pinot noir 2015 ainsi que dans le même vin additionné de 1 g/L d'extrait polyphénolique T3 et laissées en contact pendant 24 h. Les souches industrielles testées ont elles juste été réhydratées dans l'eau et observées immédiatement. Les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min, puis le culot cellulaire a été rincé avec un volume d'eau physiologique et centrifugé à nouveau avant d'être repris dans 1 ml d'eau physiologique.

Un volume de 10 μ L de culture cellulaire a été déposé sur une grille 200 mesh cuivre formvar carbone pendant 10 s, puis le volume excédentaire de culture est retiré. Un volume de 10 μ L d'acétate d'uranyle à 3 % est ensuite déposé sur la grille pendant 10 s et le contrastant excédentaire a été retiré et l'échantillon observé au MET HITACHI® H7650, en mode haut contraste.

VII.7. Analyses d'images

Les mesures de l'épaisseur de la paroi ont été effectuées grâce au logiciel ImageJ (Schindelin et al., 2015) et d'un programme type macro développé sur place pour notre problématique.

La macro permet dans un premier temps la délimitation manuelle de la membrane et de la paroi bactérienne puis de calculer les données suivantes : l'épaisseur moyenne de la paroi et son écart type, la surface totale de la bactérie et du cytoplasme.

Enfin, une modélisation de la forme de la bactérie par transposition de l'aire totale de la bactérie et du cytoplasme en cercle permet le calcul des rayons r et R et du delta des rayons ΔR correspondant à l'épaisseur de la paroi (Figure 24). Chaque image utilisée pour l'analyse nécessite d'être au même grossissement.

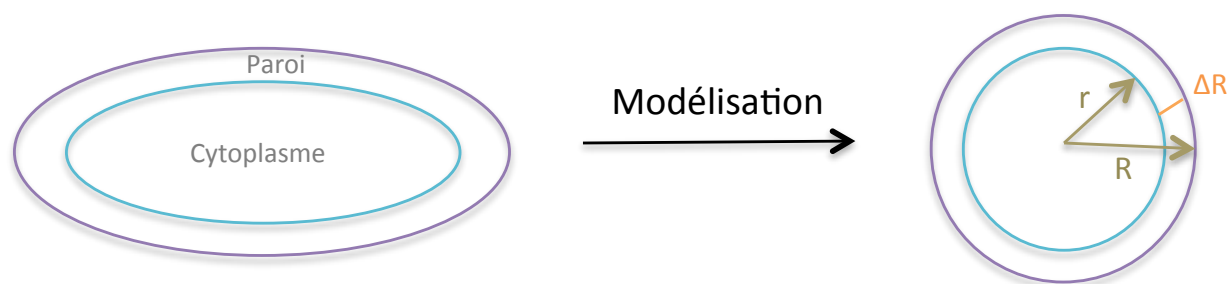


Figure 24 : Schéma de la modélisation d'une cellule bactérienne sous forme de cercle.

Les rayons sont calculés de la manière suivante :

$$R = \sqrt{\frac{\text{Aire totale de la bactérie}}{\pi}}$$

$$r = \sqrt{\frac{\text{Aire du cytoplasme}}{\pi}}$$

Le ΔR étant la différence entre R et r correspondant ainsi au rayon modélisé de la paroi.

Cette modélisation permet de minimiser les variations de l'épaisseur sur une même bactérie et de normaliser les données afin de rechercher un possible effet des polyphénols sur l'épaississement de la paroi.

VIII. Analyses polyphénoliques

VIII.1. Degré de polymérisation moyen

Le degré de polymérisation moyen (Dpm) (Drinkine et al., 2007) (Kennedy et al., 2001) est une méthode permettant de caractériser les tannins présents dans un vin ou un extrait selon leur taille. Cette technique va permettre dépolymériser chimiquement les tannins en milieux acide et à chaud en présence de phloroglucinol. Ainsi à chaque unité monomère terminale clivée va s'ajouter une molécule de phloroglucinol en position C_4 du flavan-3-ol bloquant ainsi son extension (Figure 25). Les composés adduits de phloroglucinol sont ensuite analysés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

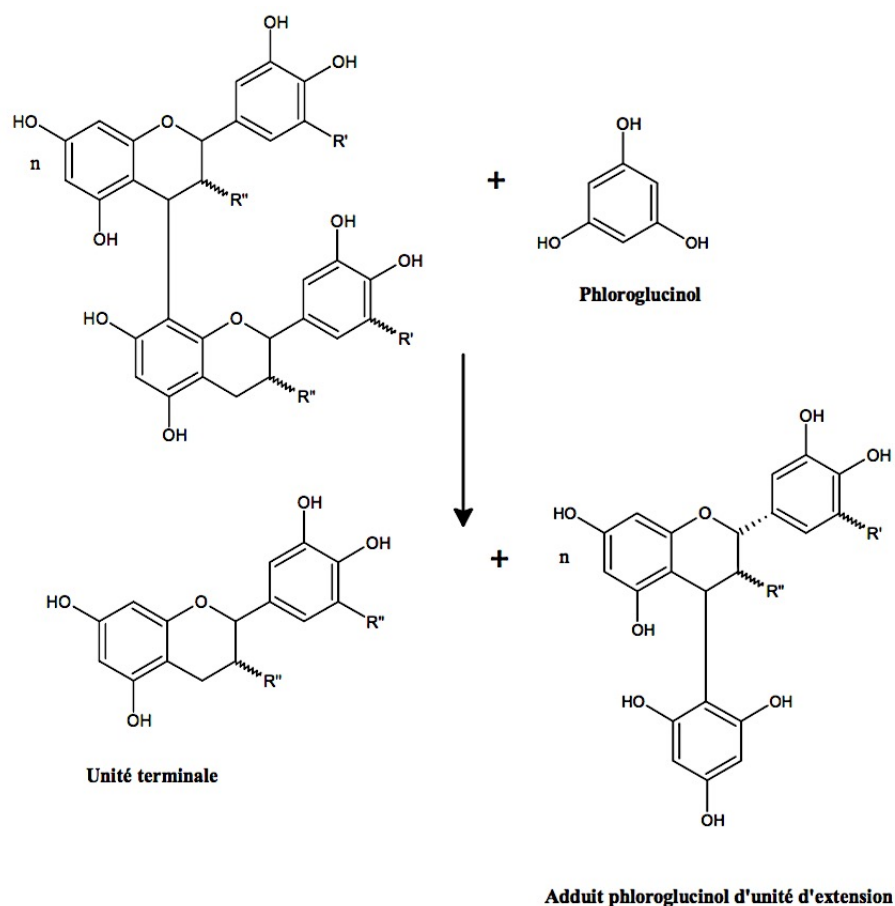


Figure 25 : Schéma du principe de la réaction de phloroglucinolyse (Chira, 2009).

VIII.1.1. Préparation des échantillons

Dans un premier temps, 5 ml de vin a été évaporé à faible pression afin d'éliminer l'éthanol présent et de le concentrer. Un volume de 20 ml d'eau distillée a été ajouté avant d'être ensuite fractionné et purifié sur cartouche C18 (12 g) (Supelco).

Un volume d'eau a été tout d'abord passé sur la cartouche C18, puis 10 ml de solution précédente est déposé. Une fois l'échantillon passé, la cartouche a été rincée une fois à l'eau distillée, puis 10 ml de méthanol (MeOH) a été élué et recueilli séparément. Ce fractionnement a ensuite été réalisé à nouveau depuis l'étape d'ajout d'eau distillée afin la deuxième fraction méthanol correspondant aux 10 ml restants.

Les deux fractions ont ensuite été combinées et évaporées à sec. Le résidu a alors été solubilisé dans 2 ml de méthanol et stocké à 4 °C avant la réaction de phloroglucinolyse.

VIII.1.2. Réaction de phloroglucinolyse

Le milieu réactionnel composé de 50 g/L de phloroglucinol, 10 g/L d'acide ascorbique en solution dans du MeOH acidifié 0,1 M en HCL a été préparé fraîchement afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Dans un vial, 200 μ L de la fraction MeOH précédente et 200 μ L de la solution réactionnelle ont été mis en contact pendant 20 min à 50 °C. La réaction a ensuite été stoppée en ajoutant 1 mL d'une solution aqueuse d'acétate de sodium à 40 mM.

VIII.1.3. Mesure par chromatographie et calcul du Dpm

Les produits de la réaction ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur un appareil UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Thermo Scientific Accela (Thermo, Electron Corporation) équipé d'un module de pompe (Accela 600 pump 920175), d'un passeur d'échantillon (Accela autosampler, 750 466), d'un détecteur à barrette de diode (Accela PDA, 930 079) couplée en série à un spectromètre de masse (MS) Thermo Scientific (MSQ Plis, MSQ20808). Le spectromètre de masse a une source d'ionisation de type électrospray (electronspray ionisation, ESI) en mode négatif. La tension de capillaire était de 3,5 kV, la tension de cône de -50 V et la température de source de 120 °C. L'ensemble des modules est piloté par le logiciel d'acquisition Xcalibur.

La colonne utilisée est une phase inverse (RP) Xterra RP18 (100 mm x 4,6 mm ; 3,5 μ m) équipée d'une pré-colonne de même phase. Deux solvants ont été utilisés : le solvant A contenant un mélange eau/acide acétique (99 : 1 ; v/v) et le méthanol comme solvant B à un débit de 1 ml/min selon le gradient d'élution suivant présenté dans le Tableau 6.

Les spectres d'absorption UV ont été enregistrés à 280 nm pour chaque échantillon injecté (20 μ L) à température ambiante (20 °C)

Tableau 6 : Gradient d'élution pour la mesure du Dpm.

Temps (min)	0	25	45	60	62	67	68	70
% solvant A	95	95	80	68	0	0	95	95
% solvant B	5	5	20	32	100	100	5	5

Les concentrations exprimées en mol/L de chaque produit de réaction ont été calculées de la manière suivante :

$$C = \frac{\text{Aire}}{\text{Coefficient d'extinction molaire}}$$

Ainsi, grâce à l'identification des composés de par leur masse moléculaire d'ionisation spécifique il a été possible de calculer le Dpm avec la formule suivante :

$$\text{DPM} = \frac{\sum \text{Concentrations en unités terminales (flavan-3-ols)} + \sum \text{Concentrations en unités d'extension}}{\sum \text{Concentrations en unités terminales libérées (flavan-3-ols)}}$$

VIII.2. Identification et quantification des monomères et des oligomères du vin

La séparation des monomères et des dimères de flavan-3-ols a été effectuée par analyse CLHP sur un appareil de séparation et d'analyse Finnigan série Surveyor (Thermo, Electron Corporation) avec un détecteur UV-Vis (Surveyor PDA Plus), et composé d'un module de pompe (Surveyor MS pump Plus), d'un passeur d'échantillons (Surveyor autosampler Plus) et d'un spectrofluorimètre (Surveyor FL plus Detector). Le détecteur de fluorescence est piloté par le logiciel ChromQuest 4.2 (Thermo, Electron Corporation) et celui UV par le logiciel Xcalibur (Finnigan El plus, 81 013).

Les monomères : (+)-catéchine (E), (-)-épicatéchine (EC), les dimères : B1, B2, B3, B4 et le trimère T ont été séparés sur une colonne phase inverse C18 LiChrospher® 100 RP18 (250 mm x 4 mm ; 5 µm).

Après avoir été filtrés (0,45 µm), les échantillons ont été injectés (20 µL) trois fois chacun et élués par un mélange de trois solvants à un débit de 1 ml/min à température ambiante (20 °C) : le solvant A contenant un mélange d'eau et de l'acide formique 99 : 1 (v/v) et le solvant B composé de 1 % d'acide formique (AF) et de 99 % d'acétonitrile (ACN) (Tableau 7).

Tableau 7 : Gradient d'élution pour le dosage des monomères et des oligomères du vin par CLHP-Fluo.

Temps (min)	0	21	22	24	25	31
% solvant A	92	82	0	0	82	82
% solvant B	8	18	100	100	8	8

La longueur d'onde de la détection UV-Vis a été de 280 nm et pour la fluorescence les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été respectivement de 280 nm et de 320 nm.

VIII.3. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes totales du vin ont été dosées grâce à une décoloration par l'action du SO_2 (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965).

Dans deux tubes à essai, 10 ml de la solution contenant (1 ml de vin, 1 ml d'éthanol à 0,1 % d'acide chlorhydrique [HCL 12 N] et 20 ml d'HCL à 2 %) a été ajouté. Puis, 4 ml d'eau distillée ont été placés dans le premier tube et 4 ml d'une solution de bisulfite de sodium à 15 % (solution du commerce $d=1,24 \text{ g/ml}$ diluée au $\frac{1}{2}$) dans le second.

La décoloration qui intervient est pratiquement instantanée, cependant les densités optiques ont été mesurées après 20 min d'attente.

L'absorbance a été mesurée à 520 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique sur spectrophotomètre. La concentration en anthocyane a ensuite été calculée en reportant la différence des densités optiques à une courbe étalon établie à l'aide de la formule suivante :

$$C_{\text{Anthocyanes}}(\text{mg/L}) = 875 \Delta d$$

VIII.4. Dosages des tannins totaux

Cette méthode de dosage est basée sur la transformation des proanthocyanidines en anthocyanidines par chauffage en milieu acide (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1966). Cette transformation va entraîner une différence de coloration avec un témoin non chauffé mesurée par spectrophotométrie.

Dans deux tubes à essai différents (normal et à hydrolyse), ont été ajoutés 4 ml de vin dilué au $\frac{1}{50}$, 2 ml d'eau distillée et 6 ml d'HCL 12 N. Puis, le tube à essai à hydrolyse a été fermé hermétiquement et placé au bain-marie à 100°C pendant 30 min, avant d'être refroidi pendant 10 min, tandis que le second tube à essai a été maintenu à température ambiante.

Une fois refroidi, 1 ml d'éthanol à 95° a été ajouté dans les deux tubes. La densité optique des deux tubes a été ensuite mesurée à 550 nm par rapport à l'eau sous 1 cm de parcours optique sur spectrophotomètre. La concentration en tannins totaux a été calculée en reportant la différence de densité optique à une courbe étalon tracée à partir de la formule suivante :

$$C_{\text{Tannins totaux}}(\text{g/L}) = 19,33 \Delta d$$

VIII.5. Extraction des polyphénols totaux du vin

Le fractionnement de différent vin a été effectué sur colonne avec résine Amberlite™ XAD-16N (diamètre 4,5 cm ; longueur 30cm). La colonne a été préparée en amont avec 900 ml de méthanol puis 600 ml d'eau distillée. Après évaporation à 50 % du vin à extraire, 100 ml d'échantillon a été déposé sur la colonne. Puis, la phase aqueuse a été collectée par passage de 600 ml du mélange eau distillée/acide formique 0,1 % (v/v) et jetée. Tandis que la phase organique contenant les polyphénols a été récupérée par le passage sur la colonne de 900 ml du mélange MeOH/AF 0,1 % (v/v).

Cette phase organique a été évaporée à sec, reprise dans 50 ml de MeOH puis à nouveau évaporée. Enfin, 50 ml d'eau distillée a été ajouté à l'extrait avant d'être congelé à -20 °C et lyophilisé à deux reprises. Les extraits ont été pesés et stockés avant utilisation.

VIII.6. Fractionnement d'extrait polyphénolique

Deux types de fractionnement ont été effectués sur l'extrait polyphénolique T3 : dans un premier l'extrait a été séparé par extraction liquide/liquide avec un mélange eau/acétate d'éthyle en deux fractions : une organique et une aqueuse afin de pouvoir tester leur pouvoir inhibiteur sur les souches.

Puis la fraction aqueuse récupérée a été séparée par précipitation au chloroforme permettant d'obtenir des fractions aux Dpm différents.

VIII.6.1. Extraction liquide/liquide

Cette technique permet de séparer les polyphénols présents dans un extrait selon leur affinité pour deux solvants, l'eau et l'acétate d'éthyle. La fraction organique va ainsi permettre l'extraction des oligomères alors que la fraction aqueuse aura plus d'affinité avec les polymères. Le schéma du protocole d'extraction est présenté dans la Figure 26.

Trois extractions successives ont tout d'abord été effectuées à partir de 5 g d'extrait T3 auxquels ont été ajoutés 400 ml d'eau distillée puis 400 ml d'acétate d'éthyle. Une fois ce mélange placé dans une ampoule à décanter puis agité et dégazé, les fractions organique et aqueuse ont été récupérées. La phase aqueuse a alors été replacée dans l'ampoule afin de subir une seconde et une troisième extraction à l'acétate d'éthyle (400 ml).

Puis, la fraction organique a été évaporée à sec tandis que la fraction aqueuse a été évaporée à 50 %. Les fractions ont ensuite été congelées avant d'être lyophilisées.

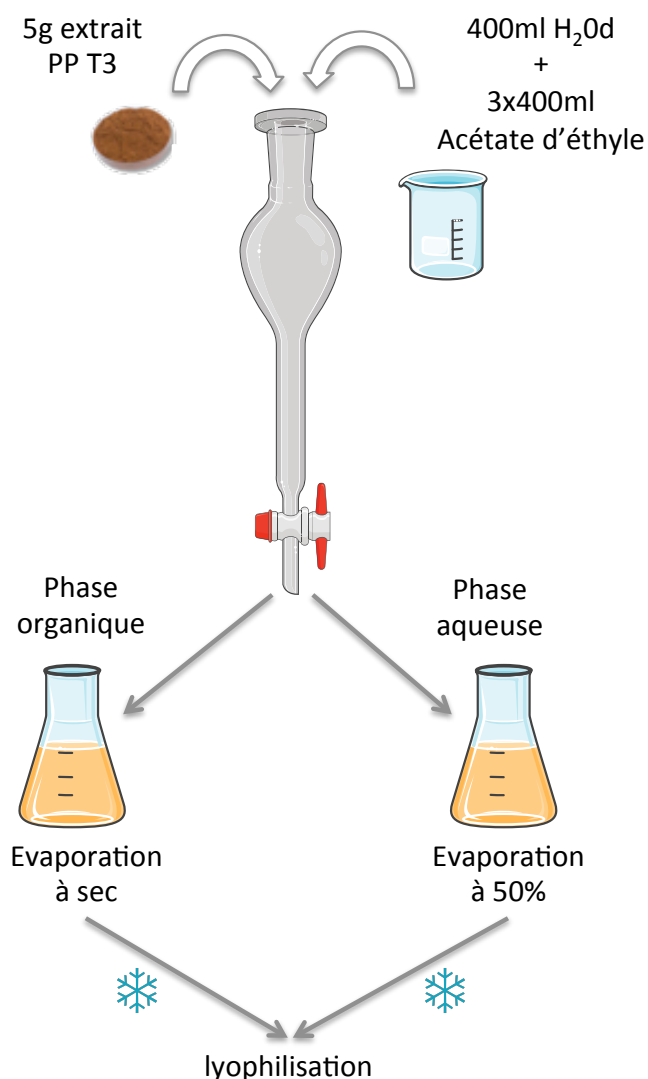


Figure 26 : Mode opératoire extraction liquide/liquide.

VIII.6.2. Fractionnement par précipitation au chloroforme

Selon les travaux de Saucier et son équipe, cette méthode de fractionnement d'un extrait tannique par précipitation successive au chloroforme permet d'obtenir des fractions contenant des polymères aux Dpm différents (Saucier et al., 2001).

Une fois la fraction aqueuse précédemment récupérée et lyophilisée, celle-ci a été solubilisée dans 200 ml de MeOH. Puis, 200 ml de chloroforme ont été ajoutés afin de précipiter une partie des tannins (Figure 27).

Ce précipité nommé F1 a ensuite été récupéré par filtration sur papier Whatman® et resolubilisé dans un faible volume de MeOH. Puis, des précipitations successives ont été effectuées par ajout de 100 ml et 167 ml de chloroforme afin de récupérer des fractions nommées F2 et F3. Le filtrat restant correspondant ainsi à la dernière fraction F4.

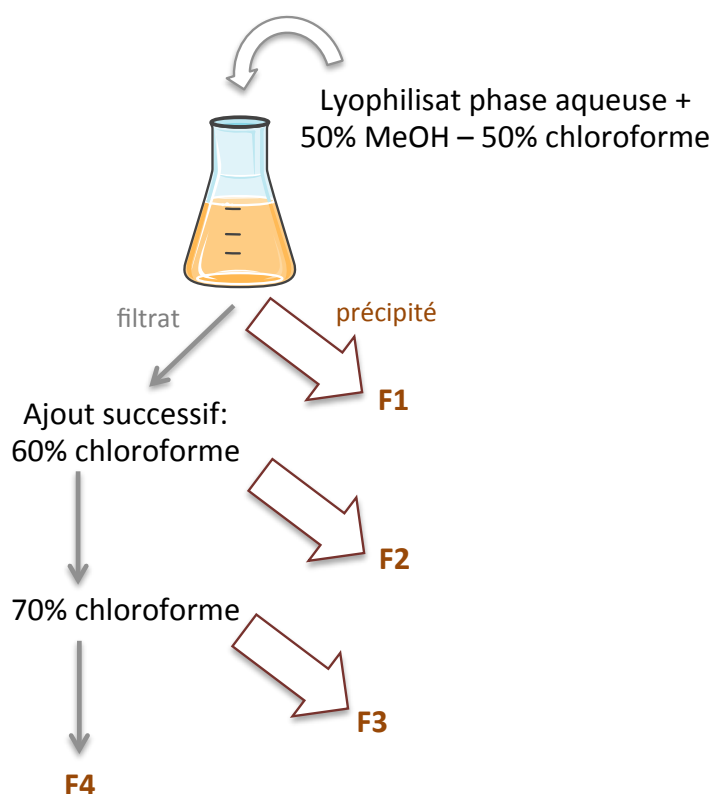


Figure 27 : Mode opératoire de la précipitation d'une fraction polyphénolique aqueuse au chloroforme adapté de (Saucier et al., 2001).

Les différentes fractions ont été évaporées sous vide avant d'être congelées à -20°C et lyophilisées. Ce protocole de séparation peut cependant être modifié en diminuant les pourcentages de précipitation au chloroforme afin d'affiner la dispersion des oligomères par rapport à leur Dpm.

IX. Analyses générales du vin

Le suivi de l'avancement des FML a été évalué en suivant la dégradation de l'acide L- malique, à l'aide d'un kit enzymatique (Boehringer, ROCHE®), une ou deux fois par semaine. Les dosages ont été réalisés en triplicata et des contrôles positifs ont été utilisés lors de chaque dosage.

Le principe du dosage de l'acide L-malique de ce kit repose sur l'oxydation de l'acide L-malique en oxaloacétate en présence du cofacteur NAD^+ et de l'enzyme L-malate déshydrogénase. La formation du NADH est alors proportionnelle à la quantité d'acide malique présente dans l'échantillon. Sa formation est suivie par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

Les échantillons de vin ont été pour certains dilués au $1/10^{\text{ème}}$ avant le dosage si la concentration en acide malique est comprise entre 0,2 et 2,0 g/L et au $1/100^{\text{ème}}$ si la concentration est supérieure à 2,0 g/L. Le dosage a été réalisé dans des plaques 96 puits à fond

plat transparent aux UV (Greiner Bio-one) et les lectures d'absorbances sont réalisées à l'aide d'un lecteur microplaques Synergy HT (BioTek).

X. Étude transcriptomique

Une étude de l'ensemble des transcrits produits par *O. oeni* en condition de stress acide et aux polyphénols a été dans un premier temps envisagée. Le séquençage de l'ARN (acide ribonucléique) total ou RNAseq permet de partir avec une hypothèse de départ neutre de tout a priori. Le RNAseq va ainsi pouvoir mesurer la totalité de l'expression des gènes avec pour avantage la possibilité d'identifier de nouveaux transcrits, gènes et donc mécanismes cellulaires.

X.1. Extraction des ARN totaux

Différentes méthodes d'extraction d'ARN ont été testées durant cette thèse afin d'obtenir des ARN de bonne qualité pour effectuer le séquençage des ARN totaux chez *O. oeni* en fonction de conditions environnementales données. La présence des polyphénols contenus dans le vin ou ceux rajoutés lors des expérimentations a en effet entraîné des difficultés et nous a poussés à rechercher le meilleur protocole d'extraction.

Les extractions d'ARN étant délicates de par la nature des ARN sensible aux Rnases, des précautions ont été prises telles que : l'utilisation de Rnase away® (ThermoFisher scientific™) pour les surfaces et le petit matériel de laboratoire, des gants de protection, ainsi que du matériel ARN free.

X.1.1. Méthode d'extraction des ARN développée par (Dimopoulou, 2013)

Les cellules ont été récoltées par centrifugation (8000 g, 10 min, 4 °C) puis le culot cellulaire a été lavé deux fois avec 1,5 ml de tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) et deux fois avec 1,5 ml d'eau DEPC (Diéthylpyrocarbonate). Le culot cellulaire a été récupéré après chaque rinçage par centrifugation (8000 g, 10 min, 4 °C). Puis celui-ci a été repris dans 1 ml de tampon d'extraction spécifique des milieux riches en polyphénols composé de 300 mM TrisHCl pH 8 ; 25 mM d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) pH 8 ; 2 M NaCl ; 2 % CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) ; 2 % PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) ; 0,05 % spermidine et 1 % de β-mercaptoéthanol qui a été ajouté au moment de l'analyse. Puis les cellules ont été broyées au FastPrep-24™ (MP Biomedicals) dans un tube à vis avec 200 µL des

billes en verre stériles (0,1 mm de diamètre) pendant 5 cycles de 45 s à une vitesse de 6,5 m/s en alternance avec des incubations de 1 à 2 min dans la glace. Cette étape permet d'effectuer une lyse mécanique et physique au froid.

Après une centrifugation de 15 min à 10 000 g (4 °C), 500 µL du surnageant obtenu a été transféré dans un tube propre, dans lequel 500 µL de chloroforme a été ajouté. Cette étape permet de solubiliser les particules hydrophobes et séparer les protéines des acides nucléiques. Le mélange a été agité 10 s au vortex et centrifugé (10 000 g, 15 min, 4 °C). La phase aqueuse supérieure contenant l'ARN a été prélevée délicatement et mise en contact avec 500 µL d'isopropanol. Le tube a alors été vortexé et incubé 20 min à -20 °C. Puis l'ARN a été récupéré par centrifugation (10 000 g 15 min, 4 °C), lavé deux fois avec 500 µL d'éthanol 75 %, séché et a été repris dans 20 µL d'eau DEPC. Tous les ARN ainsi obtenus ont été stockés à -80 °C avant analyse.

X.1.2. Méthode d'extraction des ARN par Kit Roche®

La méthode utilisée a été adaptée du protocole du Kit High pure RNA isolation (Roche®) pour les bactéries lactiques et tous les réactifs utilisés font partis de ce kit. Les différents échantillons contenant les cellules nettoyées obtenues après les FML décrites précédemment dans le paragraphe IV ont été utilisés pour l'extraction d'ARN par utilisation du kit High pure RNA isolation (ROCHE®).

Enfin, celles-ci ont été reprises dans 1 ml de ce même tampon après centrifugation (8000 g, 10min) et transférées dans un tube eppendorf de 1,5 ml.

Finalement, les cellules ont été récupérées par centrifugation 5 min à 2000 g et le culot a été remis en suspension avec 200 µL de Tris 10 mM pH 8. Puis, 60 µL de lysozyme a été ajouté et l'échantillon a été mélangé et incubé 30 min à 37 °C. Le tampon dit de lyse/-liaison a ensuite été ajouté (400 µL) et mélangé. Le tube eppendorf et le tube contenant le filtre ont été assemblés pour y déposer l'échantillon précédemment obtenu dans le réservoir supérieur (Figure 28).

Les tubes ainsi combinés avec l'échantillon dans le réservoir supérieur ont ensuite été centrifugés rapidement à 8000 g pendant 15 s et le filtrat a été éliminé. Un premier lavage de l'ARN fixé dans le filtre a été réalisé avec 500 µL de la solution de lavage n° 1 et centrifugé à 8000 g pendant 15 s. Le filtrat a été à nouveau éliminé et un second lavage a été effectué avec 500 µL de la solution de lavage n° 2, puis centrifugé (8000 g pendant 15 s). Enfin, après élimination du filtrat de la centrifugation précédente, 200 µL de la solution de lavage n° 2 a été ajouté et l'échantillon a été centrifugé à 13 000 g pendant 2 min afin d'éliminer les résidus de la solution de lavage.

Le tube à filtre a été placé dans un tube eppendorf stérile de 1,5 ml et 60 µL de la solution d'élution a été ajouté dans le réservoir. L'ARN a été récupéré par centrifugation à 8000 g

pendant 1 min traité à la Dnase (DNA-free™, Ambion) selon les instructions du fournisseur puis stocké à -80 °C avant analyse.

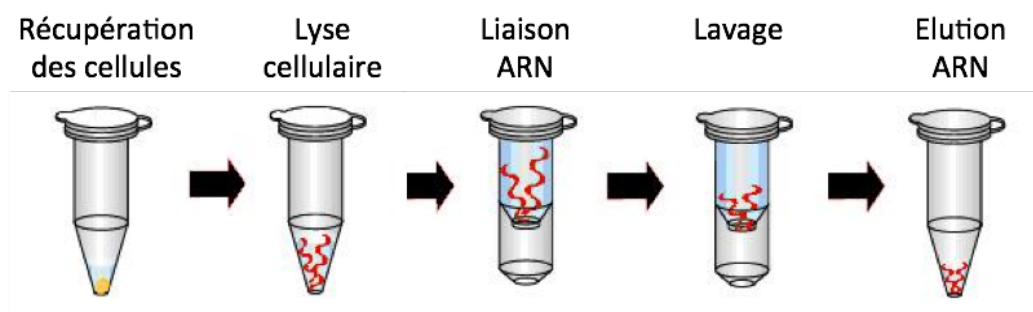


Figure 28 : Principe de l'extraction ARN (High pure RNA isolation kit, ROCHE®).

X.2. Contrôle qualité ARN

X.2.1. Électrophorèse à champ constant sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques selon leur taille grâce à un courant électrique. Les ARN chargés négativement migrent alors vers l'anode selon leur poids moléculaire. Cette technique permet de contrôler la qualité de l'extraction d'ARN par l'observation du nombre de bandes ayant migré ou non.

Les ARN (2 µL) sont dénaturés avant le dépôt sur gel par l'ajout de formamide (10 µL) et de formaldéhyde (4 µL) pendant 10 min à 65 °C.

L'agarose (1,5 % p/v) a été dissout à chaud dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2 M, Acétate 1 M, EDTA 0,05 M pH 8) puis coulé dans un moule de taille adéquate en fonction du nombre d'échantillons à analyser. Une fois le gel polymérisé, celui-ci a été placé dans une cuve de migration contenant du tampon TAE 1X et les échantillons d'ARN (6 µL) additionnés de 2 µL de bleu de charge (glycérol 50 %, TE 50 % et bleu de bromophénol 0,25 %) ont été déposés dans les puits. La migration de l'ARN a ensuite été réalisée à 80 V pendant 45 min. Puis, un bain de 10 min dans le bromure d'éthidium (BET) a été effectué afin de pouvoir observer l'ARN. En effet, le BET est un intercalant de l'ADN et de l'ARN qui fluoresce à l'exposition UV.

Les ARN ont donc été observés à la lumière UV grâce à un système d'imagerie Infinity Capt, (Fischer Scientific, Bioblock).

X.2.2. Dosage de l'ARN

Le dosage et la pureté de l'ARN ont été effectués sur Nanodrop (Biospec nano, Shimatzu biotech). Le principe de cette technique repose sur l'absorbance des acides nucléiques dans l'UV à 260 nm.

Le mode d'acquisition est réglé sur le mode ARN-40, puis un blanc est effectué avec 1 μ L d'eau ayant servi à diluer l'ARN (eau DEPC ou solution d'élution du kit ROCHE® (High pure RNA isolation kit) et 1 μ L d'échantillon est déposé sur la zone de lecture.

Une concentration en acides nucléiques et les calculs de ratio 260/230 ainsi 260/280 ont alors été obtenus. L'analyse du spectre et des ratios permet de déterminer avec la qualité générale de l'extraction d'ARN. Un ratio 260/280 supérieur à 2 indique un ARN pur, s'il est inférieur à 1,8 cela indique la présence de protéines, de groupements phénol ou d'autres contaminants. Pour un ratio 260/230 compris entre 1,8 et 2,2 cela indique un ARN pur tandis que s'il est inférieur à 1,8 cela indique la présence de contaminants co-purifiés absorbants à 230 nm (solvants, sels, contaminants organiques).

X.2.3. Mesure de l'intégrité de l'ARN

La mesure du RIN (RNA integrity number) permet par une analyse globale de l'électrophorégramme de l'échantillon de vérifier que le ratio entre l'ARN ribosomal 16S et 23S est bon et que la majorité de l'ARN n'est pas dégradé. Le RIN est donc un algorithme calculé à partir des traitements de données d'une électrophorèse capillaire qui va ainsi permettre d'assigner une valeur qualitative à l'ARN allant de 1 à 10.

L'électrophorèse capillaire repose sur le même principe que l'électrophorèse à champ constant sur gel d'agarose sauf que celle-ci est miniaturisée et nécessite seulement une très faible quantité d'ARN. Les fragments d'ARN vont donc être séparés selon leur taille grâce à un champ électrique.

La matrice gel d'ARN provenant du kit RNA 6000 nano (Agilent) a été placée dans un tube à filtre (550 μ L) puis centrifugé (1500 g, 10 min, à température ambiante). Le gel a ensuite été réparti en fractions aliquotes de 65 μ L en tube eppendorf Rnase-free et conservé pendant 4 semaines à 4 °C. Une fois, le réactif appelé « RNA-dye concentrate » a été mis à température ambiante pendant 30 min, 1 μ L de celui-ci a été mélangé à 65 μ L de gel filtré préalablement. Le mélange a ensuite été centrifugé à 13 000 g pendant 10 min. La puce a ensuite été préparée par tout d'abord l'ajout de 9 μ L du mix de gel-dye dans le puit noté **G** (Figure 29) et placée dans la base d'amorçage de l'appareil. Après la fermeture de la base d'amorçage, celle-ci a été maintenue

ventousée jusqu'au clic pendant 30 s, puis relâchée. Puis, la puce a été retirée de la base d'amorçage et 9 μ L du mix de gel-dye ont été déposés dans les deux puits notés G.



Figure 29 : Préparation des puces pour électrophorèse capillaire.

Le marqueur d'ARN (5 μ L) a été déposé dans tous les puits des échantillons alors que 1 μ L de marqueur de poids moléculaire et 1 μ L d'échantillon ont été placés dans les puits adéquats. La puce a ensuite été vortexée horizontalement pendant 1 min à 2400 rpm et analysée sur le Bioanalyzer Agilent 2100 pendant 5 min.

XI. Étude protéomique

Nous nous sommes donc ensuite dirigés vers la protéomique permettant l'étude du protéome c'est-à-dire de l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant dans sa globalité afin de répondre à nos problématiques tout en essayant de limiter au maximum l'impact des polyphénols sur cette analyse.

Le but principal de la protéomique est d'identifier, de quantifier les protéines présentes dans un échantillon biologique, mais également de déterminer leurs fonctions en corrélation avec leur expression dans différentes conditions environnementales (Aebersold & Mann, 2003).

XI.1. Préparation des échantillons

Différentes études protéomique (EP) ont été effectuées afin d'étudier les mécanismes de résistance aux stress acide et polyphénolique (Tableau 8).

I) Stress acide :

L'EP n° 1 a été effectuée dans 50 ml de moût blanc à 6 % d'éthanol dont la composition a été préalablement décrite, dans différentes conditions pH : pH 2,8 ; 3 ; 3,3 et 4 ensemencé avec la souche de cidre CRB OENO 14 217 en phase exponentielle de croissance à une concentration de

2.10⁸ cellules/ml. Après 7 jours à 25 °C, les culots cellulaires de chaque condition sont récupérés par centrifugation (10 min à 8000 g) et congelés à -80 °C.

L'**EP n° 2** a été réalisée dans 50 ml de vin blanc en triplicata à deux pH différents (pH3,3 et pH4) ensemencé avec la souche commerciale LAL01 en version liquide en phase exponentielle de croissance à une concentration de 2.10⁶ cellules/ml. Après 7 jours à 20 °C, les culots cellulaires de chaque condition sont récupérés par centrifugation (10 min à 8000 g) et congelés à -80 °C.

II) Stress polyphénolique :

L'**EP n° 3** a été réalisé dans 50 ml de moût blanc à 6 % d'éthanol (composition été préalablement décrite) dans différentes conditions (0 et 5 g/L d'extrait polyphénolique T1 ajoutés) ensemencées avec la souche de Bourgogne 14 195 en phase exponentielle de croissance à une concentration de 2.10⁶ cellules/ml. Après 7 jours à 25 °C, les culots cellulaires de chaque condition sont récupérés par centrifugation (5 min à 2000 g) et congelés à -80 °C.

Enfin, l'**EP n° 4** a été effectué dans 50 ml de vin rouge en triplicata dans différentes conditions (0 ; 1 et 2,5 g/L d'extrait polyphénolique T3) ensemencé avec la souche commerciale LAB6 en version liquide en phase exponentielle de croissance à une concentration de 2.10⁶ cellules/ml. Après 7 jours à 20 °C, les culots cellulaires de chaque condition sont récupérés par centrifugation (10 min à 8000 g) et congelés à -80 °C.

Les échantillons ont été transmis à la plate-forme de protéomique du centre génomique de Québec (Université de Laval, Canada).

Tableau 8 : Détail des différentes expérimentations de protéomique.

N° étude protéomique	Stress étudié	Souches	Matrice	Conditions	Nombre de répliques biologiques	Type d'analyse protéomique
1	Acidité	14 217	Moût blanc	pH2,8 ; pH3 ; pH3,3 ; pH4	1	Quantitative iTRAQ 4plex
2	Acidité	LAL01	Vin blanc	pH 3,3 ; pH4	3	Quantitative iTRAQ 6plex
3	Polyphénols	14 195	Moût blanc	Extrait T1 (0 et 5 g/L)	1	qualitative
4	Polyphénols	LAB6	Vin rouge	Extrait T3 (0 ; 1 et 2,5 g/L)	3	Quantitative Label free

XI.2.Extraction protéique

Pour des échantillons classiques :

Le culot cellulaire de chaque échantillon a été remis en suspension dans 300 µL de tampon de lyse (50 mM bicarbonate d'ammonium [ABC], 50 mM dithiothreitol [DTT] et 0,5 % de désoxycholate de sodium [DOC]) contenant un cocktail d'inhibiteurs à protéase (Roche®). Les cellules ont ensuite été lysées sur glace par sonication avec un sonic Dismembrator de chez Fisher® par quatre cycles de 15 s de pulse et 60 s de repos. Les échantillons ont été centrifugés à 16 000 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageant ont été mélangés avec 5 volumes d'acétone (stocké à -20 °C) et incubés pendant la nuit à -20 °C. Les protéines précipitées ont été centrifugées à 16 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le culot de protéine a alors été séché à l'air afin d'éliminer les résidus d'acétone, puis remis en suspension dans du triéthylammonium bicarbonate (TEAB) à 0,5 M et 0,5 % de DOC. Enfin, les concentrations en protéines de chaque échantillon ont été déterminées par la méthode colorimétrique de Bradford.

Pour des échantillons nécessitant l'élimination des polyphénols :

Pour chaque échantillon de l'EP n° 4 composé d'un culot cellulaire, 300 µl de tampon d'extraction a été ajouté (50 mM ABC, 50 mM DTT et 0,5 % DOC) associé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche®). Les cellules ont ensuite été lysées sur glace par sonication avec un sonic Dismembrator de chez Fisher® par quatre cycles de 15 s de pulse et 60 s de repos. Les échantillons ont été centrifugés à 16 000 g pendant 10 min à 4 °C et les surnageant ont été conservés.

La colonne à filtre 0,45 µm (Durapore membrane, millipore) a ensuite été préparée en chargeant 30 mg de PVPP (cat. #77627, Sigma Aldrich) afin d'éliminer un maximum de polyphénols contenus dans l'échantillon. En effet, la PVPP permet de fixer les polyphénols du vin (Chira, 2009; Laborde et al., 2006).

Le surnageant a été chargé sur la colonne PVPP pour une concentration finale de PVPP de 10 %, puis incubé 30 min à 4 °C sous agitation par rotation. Une centrifugation à 12 000 g pendant 5 min à 4 °C a ensuite été effectuée pour collecter les échantillons. Les surnageant ont été mélangés avec 5 volumes d'acétone (stocké à -20 °C) et incubés pendant la nuit à -20 °C afin de précipiter les protéines et concentrer les échantillons. Les protéines précipitées ont été centrifugées à 16 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le culot de protéine a alors été séché à l'air pour évaporer les résidus d'acétone, puis remis en suspension dans 40 µl de tampon de charge 1x pour migration sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE avec 12 % d'acrylamide. L'ensemble de l'échantillon a été chargé sur le gel et migré à 200 V sur une distance de moins de 1 cm afin de s'assurer que l'échantillon soit complètement rentré dans le gel. Le gel a ensuite été fixé deux

fois pendant 30 min dans une solution 50 % MeOH– 7,5 % acide acétique et coloré avec une solution commerciale de Sypro Ruby (BioRad) pendant la nuit à température ambiante à l'abri de la lumière.

Une décoloration du gel a été effectuée deux fois pendant 15 min dans une solution 15 % méthanol – 7,5 % acide acétique. Le gel a été rincé pendant minimum 15 min dans de l'eau milliQ puis les bandes d'échantillons (environ 0,8 cm x 0,8 cm) ont été prélevées pour une digestion à la Trypsine in-gel avec les modifications suivantes :

1/digestion avec 1 µg de trypsine,

2/deux séries d'extraction des peptides après digestion.

Les échantillons ont été séchés au Speedvac™ et les peptides ont été dosés au Nanodrop à une longueur d'onde de 205 nm. Les échantillons ont été préalablement repris dans 10 µl d'une solution 0,1 % acide formique.

XI.3. Dosage protéique par la méthode colorimétrique de Bradford

Cette méthode de dosage colorimétrique des protéines est basée sur la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie et les protéines. Le bleu de Coomassie est un colorant qui existe sous trois formes (anionique, cationique et neutre). Sous sa forme anionique, il se fixe aux protéines en établissant des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des protéines, mais également par des interactions avec les groupements aromatiques. C'est pourquoi le bleu de Coomassie se lie surtout aux résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine, et phénylalanine des protéines. La concentration en protéines peut ainsi être évaluée en mesurant l'absorbance à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le kit utilisé pour le dosage est le kit Bio-Rad Protein Assay. Dans un premier temps, le réactif coloré appelé « Dye reagent concentrate » a été dilué avec de l'eau déionisée à 1 pour 4 et filtrée sur papier Whatman®. Différentes dilutions de la protéine standard ont été effectuées (Bovine Serum Albumine, BSA) de manière à se placer dans un ordre de grandeur des concentrations en protéines des échantillons testés (gamme linéaire de 1,2 à 10 µg/ml de BSA). Les échantillons ont été eux aussi dilués lorsqu'il était nécessaire.

Dans des tubes eppendorf propres, 800 µL de solution standard ou d'échantillon ont été déposés (en duplicate ou triplicate), puis 200 µl de dye reagent dilué ont été ajoutés dans chaque tube et vortexés. Les tubes ont ensuite été incubés à température ambiante pendant 5 min, avant la mesure d'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre.

XI.4. Analyse protéomique quantitative type iTRAQ

XI.4.1. Principe du marquage iTRAQ

Dans le cas des deux premières expérimentations effectuées lors de cette thèse, la méthode de quantification relative et absolue par marquage isotopique dite iTRAQ a été utilisée.

Cette méthode repose sur le principe de marquage des peptides digérés par la trypsine avec une série de réactifs permettant la formation d'un lien covalent avec les amines primaires de l'extrémité N-terminale des peptides ou de la chaîne latérale des résidus lysine comme le présente la Figure 30 (Ross et al., 2004).

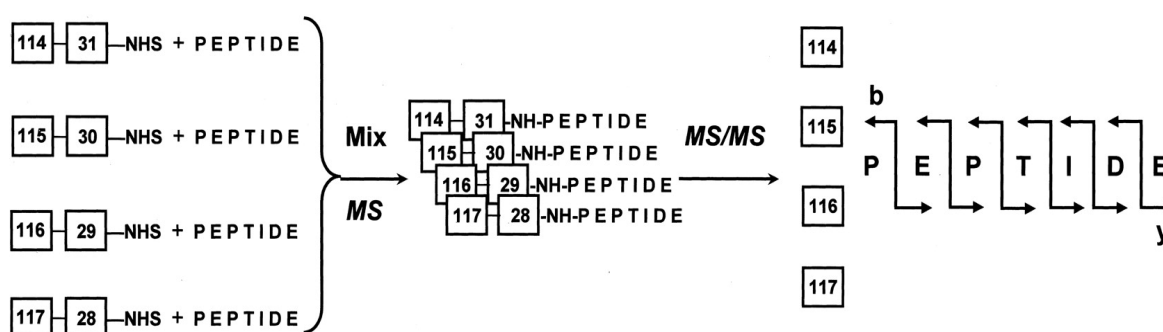


Figure 30 : Principe de l'analyse protéomique iTRAQ (Ross et al. 2004).

Les réactifs utilisés sont dits isobariques, car ils possèdent la même masse moléculaire. Ils sont composés de trois parties (Figure 31) : le reporteur chargé avec des masses variables, la balance neutre, et enfin le groupement réactif peptidique.

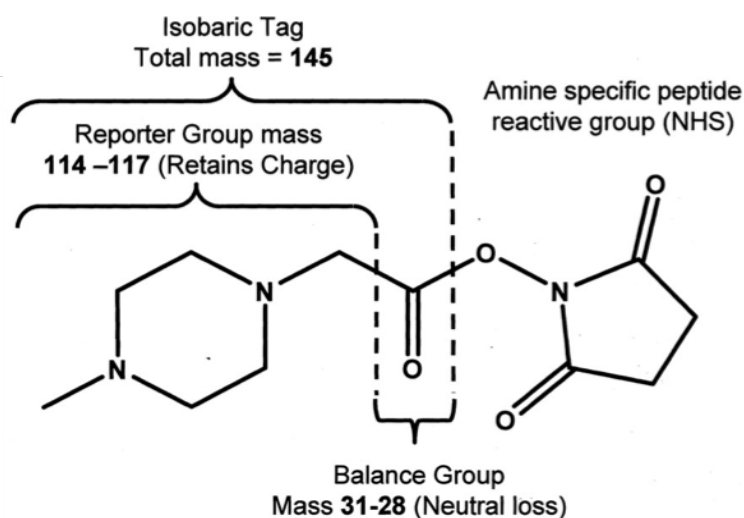


Figure 31 : Structure du réactif iTRAQ (Ross et al. 2004).

Cette méthode permet de comparer le protéome dans différentes conditions environnementales en une seule analyse grâce à l'utilisation de ces réactifs isotopiques. À l'heure actuelle, des études protéomique iTRAQ peuvent être effectuées de 4 à 12-plex notamment grâce à la variation des combinaisons des isotopes. On peut ainsi faire varier types d'isotopes (^{13}C , ^2H , ^{15}N et ^{18}O), mais également la position de l'isotope dans le groupe reporter ou le groupe balance.

XI.4.2. Marquage des échantillons

Une quantité équivalente à 50 μg de protéines pour chaque échantillon de l'**EP n°1** ou 15 μg de protéines pour chaque échantillon l'**EP n° 2** a été utilisée pour le marquage iTRAQ. Selon les instructions du kit iTRAQ du fabricant (Applied Biosystem®), les protéines ont été dissoutes dans 20 μL tampon TEAB à 0,5 M, dénaturées avec 1 μL de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 2 % et réduites avec 2 μL de Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) à 50 mM pendant 1 h à 60 °C puis refroidi jusqu'à température ambiante. Enfin, les résidus cystéine des protéines ont été bloqués dans les différents échantillons avec 1 μL de méthyle methanethiosulfate (MMTS) à 200 mM dans l'isopropanol et incubés pendant 10 min à température ambiante.

Les échantillons ont été ensuite digérés avec de la trypsine (Promega®) selon un ratio 1 pour 30 pendant la nuit à 37 °C. Après digestion, les peptides ont été acidifiés afin de précipité le DOC, puis purifiés sur cartouche HLB oasis (1cc, 10 mg, Water corp®) et lyophilisé. Les peptides lyophilisés ont été dissous dans 30 μL de TEAB à 0,5 M et marqués avec les réactifs iTRAQ. Un marquage 4-plex ou 6-plex pour respectivement l'**EP n° 1** et **n° 2** ont été effectués pendant 2 h à température ambiante dans le noir. Les peptides marqués sont rassemblés en un seul tube et évaporés avec une centrifugeuse SpeedVac™. Les échantillons ont été nettoyés sur cartouche HBL (Water corp®) et évaporés avec une centrifugeuse SpeedVac™. Puis, un fractionnement de 14 ou 7 fractions a été effectué pour les **EP n° 1** et **n° 2** à haut pH (pH 10) par chromatographie en phase inverse (Agilent 1200 HPLC). Les fractions ainsi obtenues ont été évaporées sur SpeedVac™ et remises en suspension dans de l'acide formique à 0,1 % pour l'analyse par spectrométrie de masse.

XI.4.3. Spectrométrie de masse

Pour chaque expérience, une quantité approximative de 900 ng de peptide par échantillon a été injectée, séparés par nano chromatographie liquide capillaire (nanoLC) en phase inverse online et analysée par spectrométrie de masse (spectrométrie de masse en tandem : MS/MS) avec une source d'ionisation de type ESI. L'analyse a été effectuée avec un système de chromatographie

Dionex™ UltiMate™ 3000 nanoRSLC (Thermo Fisher Scientific™ / Dionex™ Softron GmbH) connecté à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion™ (Thermo Fisher Scientific™), équipé d'un nano électrospray à ionisation.

Les peptides ont été passés à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans un solvant composé de 2 % d'ACN et 0,5 % d'acide trifluoroacétique (TFA) sur une pré colonne cartouche C18 PepMap™ (5 mm x 300 μm) (Thermo Fisher Scientific™ / Dionex™ Softron GmbH) pendant 5 min. Puis, la pré colonne est passé online avec une colonne séparative (50 cm x 75 μm de diamètre interne) remplie manuellement avec de la résine ReproSil-Pur® C18-AQ 3 μm (Dr. Maisch HPLC GmbH) et les peptides ont été élués par gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B (solvant A : AF 0,1 % ; solvant B : ACN 80 %/AF 0,1 %) en 90 min à 300 nL/min. Le spectre de masse est obtenu grâce à un mode d'acquisition des données dépendant avec le logiciel Thermo Xcalibur version 3.0.63. Un scan du spectre de masse (350 à 1800 m/z) a été acquis sur Orbitrap par cible AGC (commande de gain automatique) de 4×10^5 , un temps d'injection maximum de 50 ms et une résolution de 120 000. Un étalon interne de masse m/z 445,12003 de l'ion du Siloxane a été utilisé. Chaque scan de spectre de masse a été suivi par une acquisition de la fragmentation de spectre MS/MS de l'ion le plus intense pour un temps de cycle complet de 3 s (top speed mode). L'ion sélectionné a été isolé par un analyseur de masse quadripolaire dans une fenêtre de 1,6 m/z et fragmenté par HCD (Higher energy Collision Dissociation) avec 35 % d'énergie de collision. Les fragments ainsi obtenus ont été détectés par Orbitrap à une résolution de 60 000 avec une cible AGC de 1×10^5 et un temps d'injection maximum de 120 ms. Une exclusion dynamique des peptides fragmentés précédents a été fixée pour une période de 20 s et une tolérance de 10 ppm.

XI.4.4. Analyse bio-informatiques et traitement des données

Les spectres obtenus ont été comparés avec la base donnée protéique (7542 protéines) de *Oenococcus oeni* (tax id 1247) par le logiciel Proteome Discoverer™ (Thermo Fisher Scientific™). Le paramètre enzymatique trypsine/P a été sélectionné avec deux sites possibles de mauvais clivage. L'alkylation des cystéines a été fixée comme modification statique alors que l'oxydation des méthionines et la modification iTRAQ des terminaisons N-terminales des peptides ont été fixées comme des modifications variables.

Les tolérances de recherche des masses étaient de 10 ppm et 25 ppm pour respectivement la spectrométrie de masse et la spectrométrie de masse en tandem. Pour la validation protéique, un seuil de faux positif ou FDR (False Rate Discovery) maximum de 1 % par peptide et protéine a été utilisé basé sur la stratégie de recherche de la cible leurre. Les résultats pour protéines ainsi identifiées ont ensuite été exportés dans le logiciel Excel. Seulement les protéines ayant une variabilité entre répliques inférieurs à 20 % ont été conservées. Une protéine est considérée

comme sous-exprimée lorsque le ratio est inférieur à 0,8 et sur-exprimé lorsqu'il est supérieur à 1,2 et la p-value inférieure ou égale à 0,05.

XI.5. Analyse protéomique qualitative

XI.5.1. Préparation des échantillons

Après extraction des protéines de l'**EP n° 3** (partie XI.2), 10µg de protéine ont été déposés sur gel de 12 % acrylamide et migrés sur moins de 1 cm. Les protéines ont ensuite été fixées dans le gel avec une solution de 50 % MeOH/7.5 % acide acétique, pendant deux fois 30min. Les bandes ont été ensuite découpées (une bande par échantillon) et lavées avec de l'eau milliQ. La digestion trypsique a été effectuée selon le protocole de (Shevchenko et al., 1996) avec les modifications de (Havlis et al., 2003). Les protéines ont été réduites brièvement dans 10 mM DTT et alkylées avec 55 mM d'iodoacétamide. La digestion trypsique a été effectuée en utilisant 126 nM de Modified Porcine Trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI), à 37 °C pendant 18 h. Les peptides ont ensuite été extraits en utilisant 1 % AF /2 % ACN suivi de 1 % AF /50 % ACN. Les extraits peptidiques ont été rassemblés et séchés au Speed-vac™.

XI.5.2. Analyse par spectrométrie de masse

Les extraits peptiques ont été repris dans 12 µL de solvant composé de 2 % ACN /0.05 % TFA et 5 µL ont été injectés pour analyse en nanoLC-MS/MS : nanochromatographie Ultimate 3000 RSLC (Dionex), couplée à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific).

5 µL de chaque échantillon ont été chargés sur une pré-colonne C18 (300 µm de diamètre interne x 5 mm, PepMap, ThermoFisher) à un débit de 20 µL/min dans 2 % ACN /0,05 % TFA. Après 5 min de dessalage et de concentration, la pré-colonne a été couplée en ligne avec une colonne analytique C18 (75 µm diamètre interne x 50 cm, Reprosil) et équilibrée dans 95 % de solvant A (2 % ACN /0,1 % AF) et 5 % de solvant B (80 % ACN /0,1 % AF). Les peptides ont été élués suivant un gradient de 5 % à 40 % de solvant B durant 35 min (Durée du run= 65 min) à un débit de 300 nL/min. L'Orbitrap Fusion fonctionne en mode « data-dependant acquisition » avec le logiciel Xcalibur (version 3.0.63). Le survey scan MS a été acquis dans l'Orbitrap sur une plage de masse de 350 à 1800 m/z, en utilisant un AGC target de 4^{e5}, un maximum de temps d'injection de 50 ms et à une résolution de 120 000 (à 200 m/z). Tous les ions précurseurs les plus intenses détectés durant 3 s (mode TopSpeed) ont été isolés dans le quadrupole et

sélectionnés pour être fragmentés en HCD à une énergie de 35 %. Les ions fragments ont ensuite été détectés dans la trappe linéaire, avec un AGC target de 10^4 et un maximum injection time de 50 ms. Une exclusion dynamique des ions précurseurs de 20 s a été appliquée pour éviter la sélection redondante d'un même peptide.

XI.5.3. Analyses bio-informatiques et traitement de données

L'interrogation dans les banques de données a été effectuée avec le moteur de recherche Mascot, dans la banque TAXLeuconoOenos_1247_20150616. La trypsine a été utilisée comme enzyme et deux clivages manqués ont été autorisés. L'oxydation des méthionines, ainsi que l'acétylation des protéines en N-terminal sont définies comme modifications variables et la carbamidométhylation des cystéines est définie comme modification fixe. La tolérance de masse des précurseurs a été fixée à 10 ppm, et celle des fragments à 0.6 Da. Les peptides et protéines ont été validés en générant une banque peptidique aléatoire « decoy », où le FDR a été fixé à 1 %, pour les peptides et les protéines.

XI.6. Analyse protéomique quantitative type label Free

XI.6.1. Principe de la quantification label-free

L'approche « label-free » se base sur la comparaison des intensités des signaux MS afin d'obtenir l'abondance relative des protéines issues de chaque échantillon. En effet, dans une expérience LC-MS, l'intensité du signal lorsque le peptide est élué de la colonne chromatographique peut être suivi au cours du temps. L'aire sous la courbe du pic chromatographique d'un peptide est linéairement dépendante de sa quantité. L'intégration de cette aire sur l'ensemble de l'analyse chromatographique est la base de l'approche « label-free ». Cependant, cette méthode nécessite une quantité importante de protéines afin d'obtenir une meilleure précision lors du calcul de la quantité relative.

XI.6.2. Analyse en spectrométrie de masse

Les extraits peptidiques secs de chaque bande ont été repris respectivement dans 10 μ L d'une solution de 0,1 % FA. Pour chaque analyse en MS, 5 μ L d'extrait peptidique a été injecté. Les peptides obtenus ont été analysés par nanoLC-MS/MS : nanochromatographie Ultimate 3000

RLC (Dionex), couplée à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific).

5 μ L de chaque échantillon a été chargé sur une pré-colonne C18 (300 μ m de diamètre interne x 5 mm) à un débit de 20 μ L/min dans 2 % ACN / 0,05 % TFA. Après 5 min de dessalage et concentration, la pré-colonne a été couplée en ligne avec une colonne analytique C18 (75 μ m diamètre interne x 50cm, Reprosil) et équilibrée dans 95 % de solvant A (2 % ACN / 0,1 % FA) et 5 % de solvant B (80 % ACN / 0,1 % FA). Les peptides ont été élués suivant un gradient de 5 % à 40 % de solvant B durant 270 min (run de 300 min) à un débit de 300 nL/min. L'Orbitrap Fusion fonctionne en mode « data-dependant acquisition » avec le logiciel Xcalibur. Le survey scan MS a été acquis dans l'Orbitrap sur une plage de masse de 350 à 1800 m/z et à une résolution de 120 000 (à 200 m/z). Tous les ions précurseurs les plus intenses détectés durant 3 s (mode TopSpeed) ont été sélectionnés pour être fragmentés en HCD et les ions fragments sont détectés dans la trappe linéaire. Une exclusion dynamique des ions précurseurs de 20 s a été appliquée pour éviter la sélection redondante d'un même peptide.

XI.6.3. Analyses bio-informatiques et traitement des données

Les données brutes de quantification ont été obtenues avec le logiciel MaxQuant 1.5.5.1, avec les paramètres de recherche suivants :

Brièvement, la trypsine/P a été utilisée comme enzyme et deux clivages manqués ont été autorisés. L'oxydation des méthionines, ainsi que l'acétylation des protéines en N-terminal sont définies comme modifications variables et la carbamidométhylation des cystéines est définie comme modification fixe. Les peptides et protéines ont été validés en générant une banque peptidique aléatoire « decoy », où le FDR a été fixé à 1 %, pour les peptides et les protéines. L'identification des protéines a été effectuée par deux interrogations successives dans Andromeda : la première recherche est faite avec une précision de 20 ppm (MS) et la seconde, plus stricte, à 5 ppm. L'écart de masse maximal entre fragments MS/MS théoriques et expérimentaux est de 0,5 Da.

Après la quantification automatique par le logiciel MaxQuant, un retraitement des données brutes a été réalisé. Seules les protéines ayant été quantifiées dans les trois répliques dans au moins une des trois conditions expérimentales ont été conservées, afin d'éviter l'introduction de biais lors de la quantification.

Une étape de normalisation des valeurs d'intensités a ensuite été réalisée. En effet, il est possible que des variations d'intensité soient dues à des contraintes techniques (dosage, réponse légèrement différente du spectromètre de masse entre deux runs etc.) et non à des variations

propres aux échantillons. Pour cela, un facteur de normalisation a été calculé à partir de la médiane des intensités dans chaque condition expérimentale/moyenne des médianes.

Quelques protéines n'ont pas été identifiées et/ou détectées dans certaines des conditions, et donc aucune valeur d'intensité n'a été associée pour cette protéine. Afin de pouvoir traiter les données, les valeurs manquantes ont été remplacées par une valeur de bruit de fond. Celle-ci a été calculée en prenant le centile (1 %) des valeurs d'intensités normalisées, pour chaque condition.

Pour chaque condition, le ratio suivant a été calculé :

$$r = \frac{\text{Moyenne des intensités des réplicats biologiques dans la condition expérimentale}}{\text{Moyenne des intensités des réplicats biologiques dans la condition contrôle}}$$

Les seuils de ratio pour lesquels une protéine est considérée comme variante ont alors été fixés dépendamment de la distribution des données.

Un test de Student (t-test) sur les valeurs d'intensités normalisées a également été réalisé afin de contrôler la significativité des données. Une protéine est alors considérée comme sur-exprimée si le ratio > 1,2 et si la p-value < 0,05 ; ou bien sous-exprimées si le ratio < 1,96 et si la p-value < 0,05.

XII. Analyses Bioinformatique

XII.1. Analyses statistiques

Afin de connaître si les variations entre les souches et/ou les différentes modalités testées sont significatives, une première étape de recherche de l'homogénéité des variances a été effectuée afin de choisir entre des tests paramétriques ou non paramétriques. Les différents jeux de données ne permettant pas d'effectuer un test statistique paramétrique type ANOVA (variances non homogènes), le test de Kruskal Wallis avec un α de 0,05 a été privilégié. Le logiciel Rstudio Team (2015) : Integrated Development for R. Rstudio, Inc., Boston, MA ; URL <http://www.rstudio.com/> a été utilisé pour l'ensemble de l'étude statistique. Les packages utilisés ont été les suivants : «vegan» ; «multcomp» ; «caret» ; «DiscriMiner» ; «agricolae».

De plus, l'analyse des données de protéomique a été effectuée dans un premier en recherchant une homologie entre les protéines identifiées et les protéines des voies de la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pour l'unique souche d'*O. oeni* disponible sur cette base de données (PSU1) (Kanehisa et al., 2013).

L'analyse des voies et leurs enrichissements pour les conditions testées ont été effectués grâce au logiciel Rstudio cité précédemment avec les packages suivant : « pathview » ; « DOSE » ; « clusterProfiler » ; « gage » ; « KEGGREST » ; « GeneAnswers » ; « reshape2 » ; « ggplot2 ».

XII.2. Analyses génomiques

L'étude de l'organisation des opérons polysaccharidiques EPS1 et EPS2 a été effectuée grâce à l'application Seed Viewer (<http://pubseed.theseed.org/>) intégrant le serveur RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology ; rast.nmpdr.org). Ces outils ont permis la recherche d'homologie entre les séquences protéiques de référence établies par (Dimopoulou et al., 2014) et les génomes des deux groupes de souches issues de vin blanc et vin rouge de Bourgogne.

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Étude de la résistance aux polyphénols et à l'acidité de souches d'*O. oeni* spécifiques de vins blancs ou rouges

I. Objectifs de l'étude et choix des souches

Le principal objectif de cette thèse était d'analyser le comportement de différentes souches d'*O. oeni* en présence de polyphénols afin de comprendre pourquoi la FML se réalise généralement mieux dans les vins les moins riches en polyphénols et pourquoi certaines souches se développent mieux que d'autres en présence de ces composés. Par conséquent, nous avons choisi de démarrer les travaux en comparant des souches appartenant à deux groupes adaptés aux vins blancs et vins rouges.

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées par El Khoury (2014) en Bourgogne, mais également dans le Val de Loire, en Champagne et dans le Bordelais. Elles avaient été génotypées par MLVA-VNTR et par une méthode basée sur l'analyse des SNP qui avaient montré que ces souches forment deux groupes génétiques distincts pouvant être classés selon leur de produit : vin blanc et vin rouge (Khoury, 2014). Les travaux réalisés par la suite par Campbell-Sills d'après la séquence de leurs génomes ont permis de décrire les relations phylogénomiques existantes entre les souches (Campbell-Sills et al., 2015). Les auteurs ont montré que les souches se regroupent bien selon le produit d'origine, que celles appartenant à un même groupe sont génétiquement proches et que les deux groupes de souches sont également proches l'un de l'autre. Cela suggère que les souches seraient apparues en Bourgogne à partir d'un même ancêtre commun et qu'elles se seraient adaptées soit aux vins blancs, soit aux vins rouges produits dans cette région, avant de disséminer dans d'autres régions. Ces souches peuvent donc être classées en deux groupes distincts selon leur type de produit d'isolement et leur proximité génétique : le groupe VB pour les souches isolées de vin blanc et les souches VR pour les souches isolées de vin rouge.

Le Tableau 9 présente les souches des deux groupes qui ont été analysées dans cette étude et la Figure 1 leur relation phylogénomique par rapport aux autres souches connues.

Tableau 9 : Origines des souches des groupes VB et VR.

Souche	Groupe génétique	Origine géographique	Type de produit et cépage
14 195	VB	Bourgogne, Côte de Beaune, Puligny Montrachet	Vin blanc, Chardonnay
14 196	VB	Bourgogne, Côte de Beaune, Puligny Montrachet	Vin blanc, Chardonnay
14 198	VB	Bourgogne, Beaune	Vin blanc, Chardonnay
14 202	VB	Bourgogne, Meursault	Vin blanc, Chardonnay
14 203	VB	Bourgogne, Meursault	Vin blanc, Chardonnay
14 206	VR	Bourgogne, Haute Côte de nuit	Vin rouge, Pinot noir
14 208	VR	Bourgogne, Santenay	Vin rouge, Pinot noir
14 210	VR	Bourgogne, Mercurey	Vin rouge, Pinot noir
14 213	VR	Bourgogne, Mercurey	Vin rouge, Pinot noir
14 214	VR	Val de Loire	Vin rouge

Il est possible que la croissance des souches du groupe VR soit favorisée dans les vins rouges en raison d'une meilleure résistance aux polyphénols. Néanmoins, d'autres paramètres doivent intervenir pour expliquer leur absence dans les vins blancs, comme la cinétique de croissance ou la résistance à l'acidité, qui pourraient être plus favorables aux souches du groupe VB et expliquer leur prédominance dans les vins blancs. Par conséquent, pour tenter de comprendre pourquoi les souches de ces deux groupes sont si spécifiques à deux types de vins différents, nous avons tout d'abord analysé leurs cinétiques de croissance, puis leur résistance à l'acidité et aux polyphénols. Les essais ont été réalisés aussi bien dans un milieu « jus de raisin » mimant le moût, que dans des vins, ceci afin de déterminer à quel stade de la vinification se produit la sélection des souches de l'un ou de l'autre groupe.

II. Comparaison des phénotypes dans le moût

II.1. Cinétique de croissance

Pour déterminer si la prédominance des souches d'un des deux groupes dans un type de vin ou un autre pourrait être due à des différences de cinétique de croissance dans le moût, nous avons comparé la croissance des souches dans une matrice de type « jus de raisin » rouge ajustée à différents pH, dans la gamme des pH des vins (2,8-4,0). Chaque souche a étéensemencée à 10^2 cellules/ml en duplicata et sa croissance a été suivie par dénombrement sur boîte pendant

environ 14 jours. Les courbes de croissance sont présentées pour chaque souche dans la Figure 32 et pour l'ensemble des souches des deux groupes dans la Figure 33.

Les pH 4 et pH 3,6 sont les plus favorables à la croissance de l'ensemble des souches. Elles semblent entrer directement en phase exponentielle de croissance dès 24 ou 48 h après inoculation. Aux pH les plus élevés (pH 4 ; pH 3,6 et pH 3,3), la phase stationnaire est atteinte assez rapidement (en 192 h) par l'ensemble des souches. À pH 3, la croissance est retardée par rapport aux pH supérieurs, mais la population bactérienne parvient tout de même en moyenne à atteindre 10^8 UFC/ml en 336 h. À pH 2,8, les souches des deux groupes ont des difficultés à croître et ne dépassent pas pour la plupart 10^4 UFC/ml après 14 jours (336 h), même si certaines souches comme 14 214 et 14 206 semblent commencer à se développer.

Au sein d'un même groupe, des différences de comportement des souches ont parfois été notées. Après 14 jours, elle ne parvient qu'à environ 10^4 UFC/ml, contrairement aux autres souches du groupe qui atteignent 10^8 UFC/ml. De plus, aucune différence de croissance n'a été constatée entre les deux groupes de souches, dans cette matrice et aux pH testés. Par conséquent, il ne semble pas que ce soit des différences de cinétique de croissance qui puissent expliquer le meilleur développement des souches d'un groupe ou d'un autre dans un type de vin ou un autre. Néanmoins, le jus de raisin rouge utilisé contenait des polyphénols qui pourraient être un stress supplémentaire et pourraient affecter plus particulièrement les souches issues de vin blanc. De plus, lors de la fermentation alcoolique, la production d'alcool par les levures ajoute un stress supplémentaire qui pourrait également affecter la croissance des cellules et peut être de manière différente selon le groupe de souche.

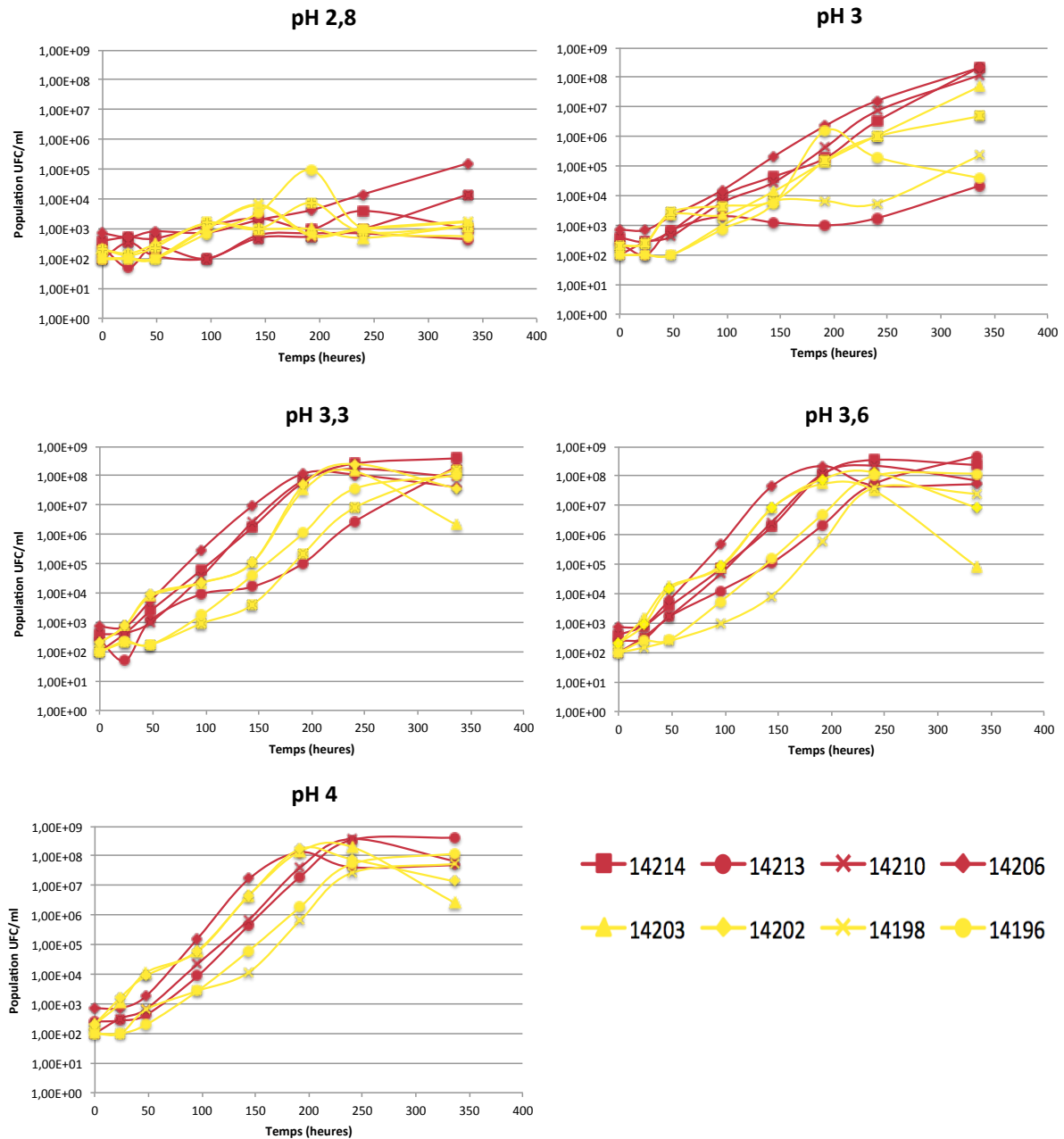


Figure 32 : Croissances des souches des groupes VB et VR dans le moût et à différents pH.

La croissance des souches issues des deux groupes génétiques distincts VB (a/**jaune**) et VR (b/**rouge**) a été suivie dans un milieu jus de raisin rouge ajusté à un pH de 2,8 à 4. Chaque culture a été réalisée en duplicata et chaque dénombrement sur milieu gélosé a également été dupliqué. Les courbes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas de chaque souche.

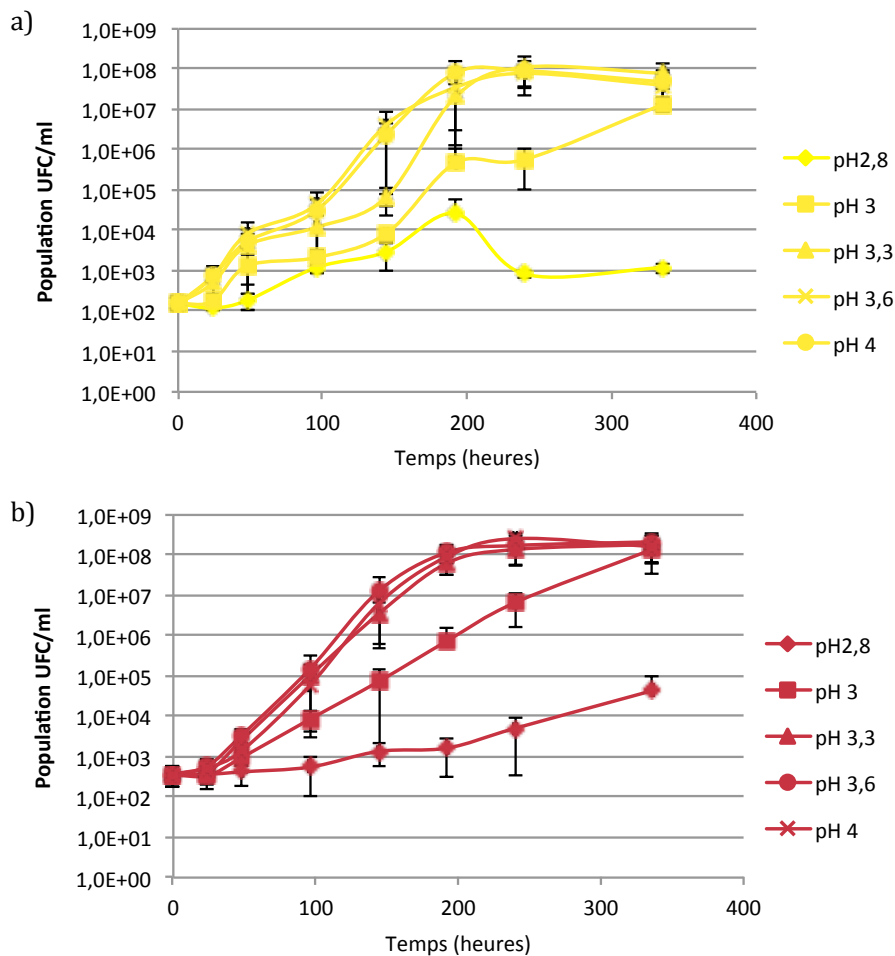


Figure 33 : Croissances moyennes des souches de chaque groupe.

Les courbes représentent les moyennes et écarts types des cinétiques de croissance de chaque souche. Les données sont issues des valeurs de la Figure 32, avec en a) le groupe VB et b) le groupe VR.

II.2. Influence de l'acidité du moût

Bien que l'acidité ne semble pas influencer de manière significativement différente la croissance des souches des deux groupes VB et VR dans le moût, nous avons recherché si elle pourrait jouer un rôle dans leur survie, en particulier pour les valeurs de pH les plus faibles. La résistance des souches des deux groupes a donc été testée en les inoculant dans un moût de raisin blanc ajusté à différents pH et à 6 % d'éthanol pour mimer les conditions rencontrées par les bactéries en début de vinification. Les différentes souches ont tout d'abord été cultivées en milieu « jus de raisin » jusqu'en phase de croissance exponentielle, puis inoculées à $2,0 \times 10^6$ cellules/ml dans les milieux de test et leur survie a été mesurée après 2 et 7 jours.

D'après les résultats de la Figure 34, à 48 h, les souches du groupe VB ont un meilleur taux de survie que celles de l'autre groupe aux pH 3,3 ; 3,6 et 4. En effet, à ces valeurs de pH, la survie des souches VB est supérieure au taux d'inoculation (100 %) et atteint parfois plus de 1000 %, soit 10^7 UFC/ml. Cette différence est moins flagrante aux pH les plus bas (2,8 et 3,0), car même si l'ensemble des souches du groupe VB a une survie autour de 100 % et que seule la souche 14 213 du groupe VR semble résister à ce niveau d'acidité, l'analyse statistique suggère qu'il n'y a pas une différence nette entre les deux groupes à ces pH.

Une situation différente est observée après 7 jours. En effet, aux pH les plus élevés (3,6 et 4,0), toutes les souches ont pu se développer. Leurs populations ont atteint plus ou moins 10^8 cellules/ml, celles du groupe VR étant sensiblement supérieures aux autres. À l'inverse, aux pHs les plus bas (2,8 à 3,3), les souches du groupe VB sont significativement plus résistantes que celles du groupe VR. En effet, à pH 3,3, elles se sont autant développées qu'aux pH les plus élevés, alors qu'à cette valeur, celles du groupe VR se sont moins développées que lorsqu'elles étaient à pH 3,6 ou 4,0. Mais surtout, à pH 3,0, toutes les souches du groupe VB ont une survie supérieure à 100 %, alors que pour les souches du groupe VR, seule 14 214 dépasse le taux d'inoculation, les autres ayant un taux de survie de 0,5 à 50 %. Et au pH le plus bas (2,8), toutes les souches du groupe VR ont fortement décliné, avec un taux de survie allant de 0 à 20 %, alors que celles du groupe VB ont un taux de survie supérieur à 100 % pour 14 196 et 14 202, ou autour de 20 % pour 14 198 et 14 203.

Contrairement aux observations réalisées en suivant la croissance des cellules dans le moût (II.1), ces résultats suggèrent que l'acidité du moût a une influence très différente selon le type de souche (groupe VB ou VR), notamment aux pH les plus bas. Les souches du groupe VB semblent bien adaptées pour survivre et se développer à ces valeurs de pH, qui sont souvent rencontrées dans les vins blancs. À ces valeurs de pH, les résultats des deux expérimentations semblent donc contradictoires, mais il est probable que dans le premier essai le taux d'inoculation (10^2 cellules/ml) était trop faible pour qu'il subsiste des cellules après la phase de mortalité initiale liée à l'inoculation, alors qu'à 10^6 cellules/ml, la population résiduelle était encore suffisamment importante pour que les cellules se développent de nouveau. De plus, les moûts utilisés étaient sensiblement différents, ce qui a pu influencer leur survie.

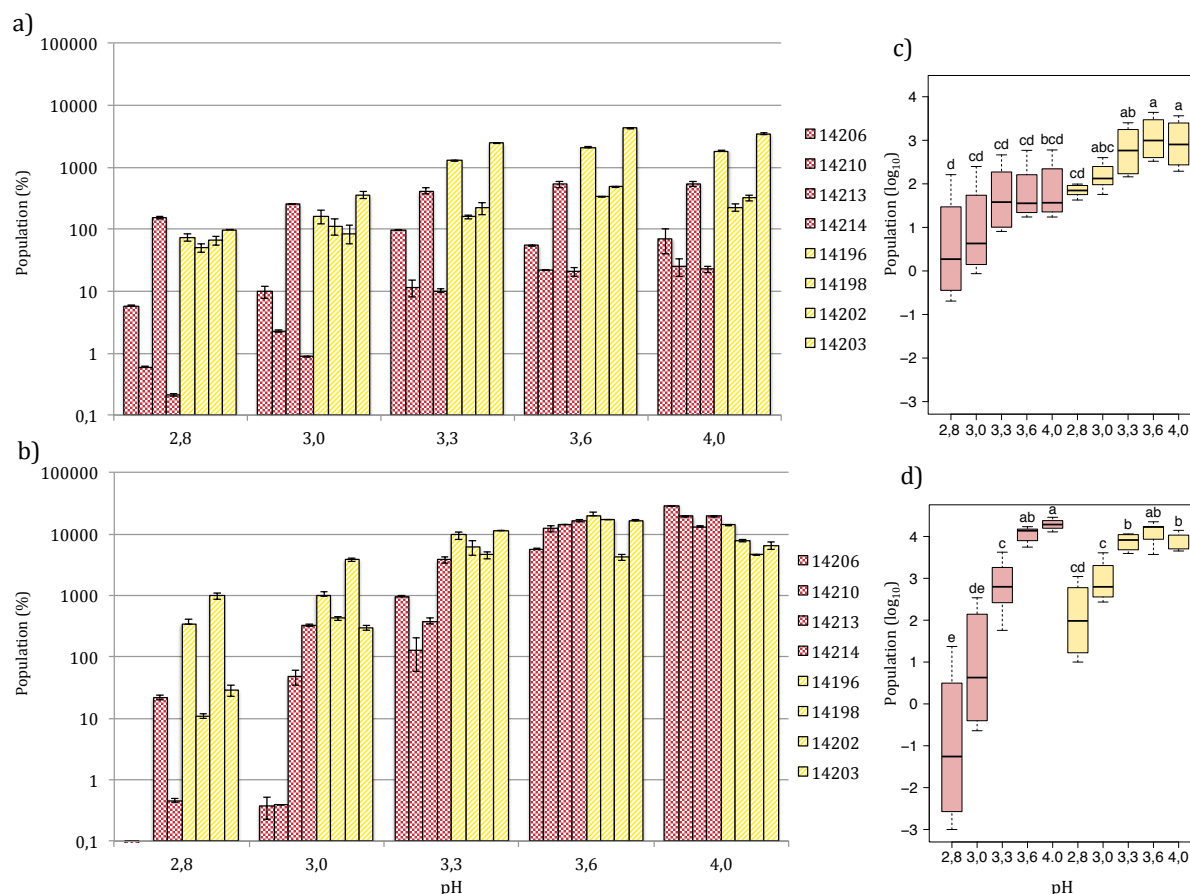


Figure 34 : Survie des souches des groupes VB et VR dans le moût en fonction du pH.

Quatre souches de chaque groupe VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un milieu jus de raisin ajusté à 6 % d'éthanol, et à pH 2,8 à 4,0. Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé après 48 h (a) et 7 jours (b). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

II.3. Influence des polyphénols dans le moût

Les résultats précédents suggèrent que les souches du groupe VB se développent mieux que les autres dans les moûts de pH très bas, ce qui pourrait expliquer leur prédominance dans les vins blancs. De la même manière, il est possible que la croissance des souches du groupe VB soit favorisée par la présence de polyphénols dans les moûts de raisin rouge. Pour le tester, nous avons mesuré l'impact de différentes préparations de polyphénols.

II.3.1. Extraits de polyphénols totaux de vins

Une expérience préliminaire a été réalisée en utilisant des extraits de polyphénols totaux préparés à partir d'un vin de Cabernet Sauvignon et de trois vins de Merlot (2 vins de goutte et un vin de presse). Les extraits obtenus ont subi deux évaporations à sec et deux lyophilisations afin d'éliminer les résidus d'acide acétique et de solvant organique utilisés lors de l'extraction et susceptibles de modifier le comportement des souches.

Les tests ont été réalisés dans un moût de raisin blanc ajusté à 6 % d'éthanol et à pH 4,0, car les résultats précédents ont montré que les souches des deux groupes ont eu des comportements similaires à cette valeur de pH. Les quatre types d'extraits polyphénoliques ont été additionnés à 0 ; 0,5 ; 1 ou 2 fois la concentration mesurée dans les vins à partir desquels ils avaient été extraits. Deux souches de chaque groupe VB (14 195 et 14 196) et VR (14 206 et 14 208) ont été testées en les inoculant à 2×10^6 cellules/ml et en suivant leurs populations après 48 h et 7 jours. Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

Globalement, les quatre souches ont bien toléré toutes les préparations de polyphénols à toutes les concentrations testées. En effet, toutes les populations mesurées sont supérieures au taux d'inoculation et sont même, dans certains cas, 100 fois supérieures à celui-ci. L'extrait qui est issu du vin de presse de Merlot semble avoir eu un effet plus important sur les deux souches du groupe VB, notamment lorsqu'il a été utilisé à la plus forte concentration et après 48 h. Néanmoins, même dans ces conditions, ces souches se sont développées et ont atteint des niveaux de population importants au bout de 7 jours. Bien que ces résultats ne montrent pas que les polyphénols pourraient avoir un effet inhibiteur assez important pour favoriser le développement de certaines souches, il est surprenant qu'aucune inhibition n'ait été observée. Par conséquent, il est possible que les conditions de tests n'aient pas permis de montrer l'effet inhibiteur des polyphénols tel qu'il est constaté empiriquement dans les vins. La composition et/ou la concentration des extraits utilisés, ou bien le type de milieu utilisé pour ces tests étaient probablement inadaptés.

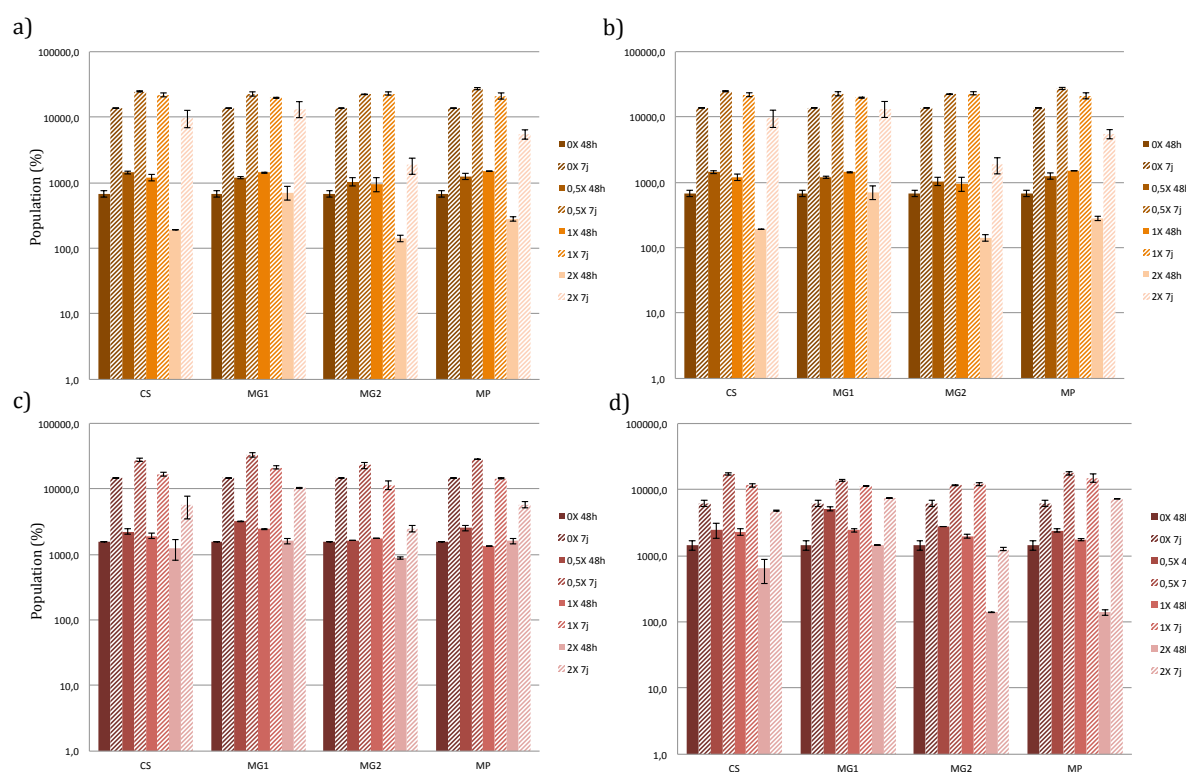


Figure 35 : Effet de différents extraits polyphénoliques de vins sur la survie de souche du groupe VB et VR.

Deux souches de chaque groupe VB : 14 195(a), 14 196(b) et VR : 14 206(c), 14 208(d) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un milieu jus de raisin blanc en présence de 6 % d'alcool, un pH 4, avec des extraits polyphénoliques totaux issus de différents vins (CS: Cabernet sauvignon; MG1: Merlot 100 % goutte n° 1; MG2: Merlot 100 % goutte n° 2; MP: Merlot 100 % presse). Les concentrations finales en polyphénols représentent 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 fois la concentration initiale du vin. Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h et à 7 jours. Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types.

II.3.2. Extraits de polyphénols commerciaux

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi de réaliser de nouveaux essais, mais cette fois-ci en testant les 8 souches représentatives des deux groupes VB et VR qui avaient été utilisées pour évaluer la résistance à l'acidité, et surtout, en utilisant des préparations commerciales de polyphénols, ce qui permettait de ne pas être limité par les quantités nécessaires à la réalisation de l'ensemble des tests. Comme précédemment, les souches des deux groupes ont été inoculées dans un moût de raisin blanc à 6 % d'éthanol et ajusté à un pH de 4,0, mais cette fois-ci additionné de 0, 1, 2,5 ou 5 g/L de différents extraits polyphénoliques nommés

T1, T2 et T3. Ces extraits sont décrits dans le Tableau 5. Ils ont été choisis, car ils correspondent à différentes catégories de polyphénols du vin.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 36. Assez étonnamment, 48 h après inoculation, les souches du groupe VB ont une croissance significativement supérieure à celle des souches du groupe VR dans l'ensemble des conditions, sauf en présence de l'extrait T2 à 5 g/L. Cependant, 7 jours après inoculation, il n'y a plus de différence significative entre les deux groupes de souches VB et VR pour l'ensemble des conditions testées. Les polyphénols ne peuvent donc pas être responsables de la sélection des souches du groupe VR, au moins au niveau du goût.

Bien qu'il n'y ait pas de différences selon le type de souches, des effets différents sont observés en fonction du type d'extrait et de la concentration utilisée. Ainsi, l'extrait T1, qui est composé d'un mélange de tannins et d'anthocyanes, n'a aucun effet aux concentrations 1 et 2,5 g/L sur les deux groupes de souches, mais entraîne une réduction significative de la croissance à 5 g/L, en comparaison avec un témoin sans ajout de polyphénols. Cependant, dans ce cas précis les souches des groupes VB et VR sont tout de même en forte croissance, car leurs populations sont 5 à 50 fois supérieures au taux d'inoculation. L'extrait T2, composé principalement de tannins monomères (Dpm=1,1), n'a aucun effet à 1 g/L, mais à 2,5 et 5 g/L il entraîne une diminution significative de la croissance de toutes les souches. Là encore, même en présence de 5 g/L, l'ensemble des souches a une survie supérieure au taux d'inoculation. L'ajout de l'extrait polyphénolique T3, principalement composé de tannins polymères (Dpm=4,5), a un effet significatif sur la survie de toutes les souches dès la plus faible concentration (1 g/L). Dans cette condition, les souches sont toujours en croissance, mais celle-ci est fortement ralentie. À 2,5 g/L, il n'y a pratiquement plus aucune croissance des cellules qui restent au niveau de leur taux d'inoculation après 7 jours. Et à 5 g/L on observe une très nette mortalité des cellules après 7 jours. L'extrait T3 est donc l'extrait polyphénolique ayant le plus d'impact sur la survie des souches des deux groupes VB et VR, mais aucune différence significative n'a été observée dans les comportements des souches des deux groupes.

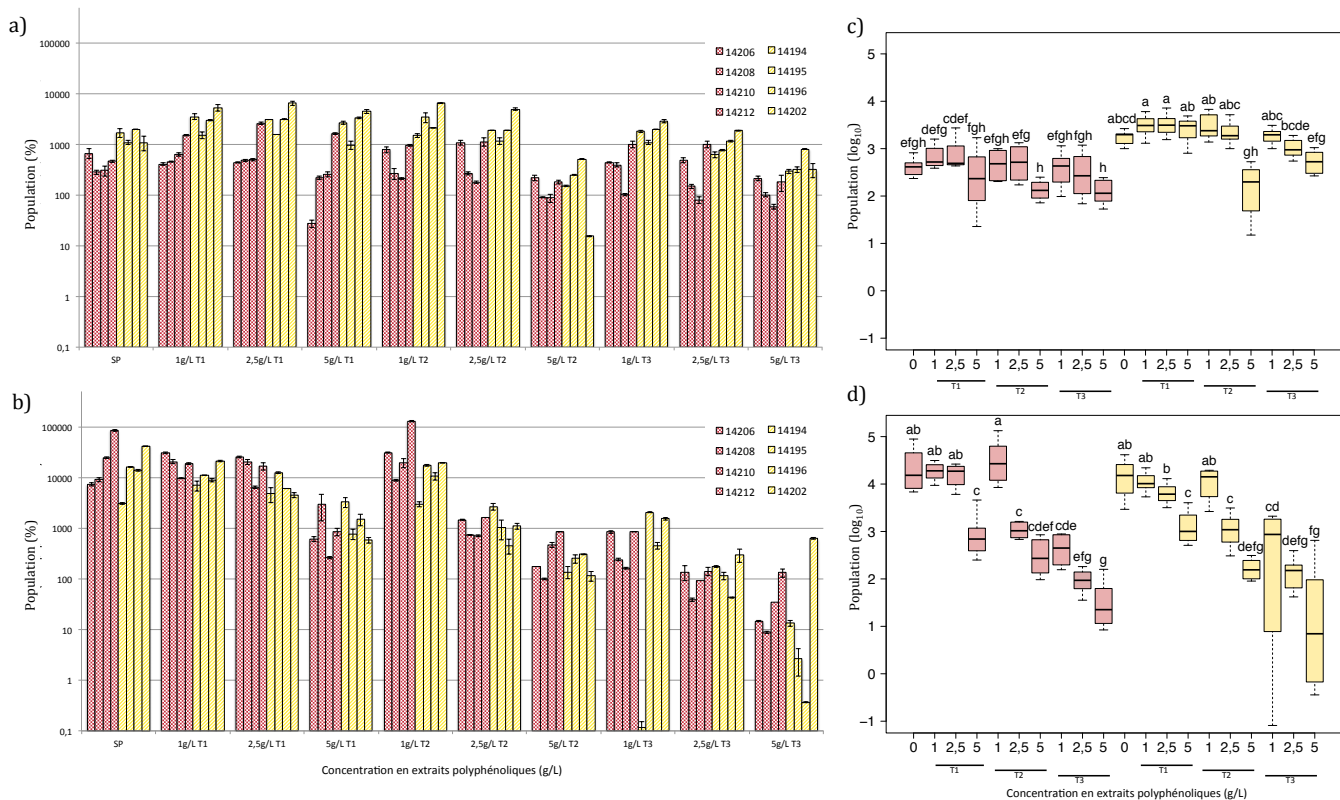


Figure 36 : Survie des souches des groupes VB et VR en fonction du type et de la quantité de polyphénols au cours du temps dans un moût.

Quatre souches de chaque groupe, VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un milieu jus de raisin blanc en présence de 6 % d'alcool, un pH 4, avec différents extraits polyphénoliques (T1, T2 et T3) à des concentrations variant de 1 à 5 g/L ou sans ajout de polyphénols (SP). Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a) et à 7 jours (b) et une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée à 48 h (c) et à 7 jours (d). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

III. Comparaison des phénotypes dans le vin

En analysant leur comportement dans le moût, nous avons constaté que les souches des deux groupes VB et VR ont un comportement similaire en présence de polyphénols, mais variable en fonction du pH, celles du groupe VB étant plus tolérantes aux pH les plus bas. Pour approfondir leur analyse et tenter de comprendre pourquoi ces souches sont préférentiellement associées aux vins blancs ou rouges, nous avons comparé leurs comportements en fonction du pH et des polyphénols dans le vin. Ces paramètres ont été testés dans deux types de matrices : un vin blanc de Chardonnay et un vin rouge de Pinot noir.

III.1. Influence du pH du vin

Un premier essai a été réalisé en inoculant les bactéries dans un vin de Chardonnay contenant 12,7 % d'éthanol et ajusté à différents pH (Figure 37). Lorsque les bactéries sont inoculées dans le vin, on observe systématiquement une certaine mortalité. Ce phénomène est bien visible aux pH 3,6 et 4,0 pour lesquels toutes les souches ont des populations inférieures au niveau d'inoculation après 48 h, alors que ces populations augmentent après 7 ou 14 jours. Ces valeurs de pH sont donc bien tolérées par l'ensemble des souches, bien que celles du groupe VB atteignent des populations maximales sensiblement supérieures aux autres.

Aux pH les plus bas, de 2,8 à 3,3, il y a au contraire une très nette inhibition des bactéries, qui varie selon le pH, le groupe de souche et le temps d'exposition. Aucune cellule ne survit à pH 2,8 dès 48 h après inoculation. Ceci est contraire à ce qui avait été observé dans le moût, mais ce n'est pas surprenant, car dans le vin les cellules subissent les effets cumulés du pH et de la présence d'une forte teneur en éthanol. À pH 3,0, la situation est presque la même, car aucune souche du groupe VR ne survit et quelques souches du groupe VB sont encore détectables après 48 h, mais elles ont totalement disparu à partir de 7 jours. À pH 3,3, 48 h après inoculation, toutes les cellules sont inhibées comme cela est observé aux autres pH. Après 7 jours, l'inhibition se poursuit, avec un taux de survie de l'ordre de 10 % pour la quasi-totalité des souches. Enfin après 14 jours, une différence importante apparaît entre les deux groupes de souches. En effet, celles du groupe VB reprennent une certaine croissance jusqu'à atteindre un niveau de population proche de celui d'inoculation, alors que celles du groupe VR restent à un niveau très faible.

Un deuxième essai a été réalisé comme précédemment, mais en utilisant cette fois un vin rouge de Pinot noir (N° 3) contenant 12,6 % d'éthanol et 1,3 g/L de polyphénols totaux. La composition en polyphénols de ce vin est détaillée dans le Tableau 4. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 38. Comme dans le vin blanc, l'inoculation dans ce vin entraîne une certaine mortalité de toutes les cellules, qui est visible après 48 h, même aux pHs les plus élevés (pH 3,6 et 4,0). Mais alors que les souches du groupe VR reprennent une croissance active dès 7 jours et atteignent des populations 10 fois supérieures au taux d'inoculation au bout de 14 jours, celles du groupe VB restent fortement inhibées et en dessous de leur niveau d'inoculation même après 14 jours. Aux pHs les plus bas, on observe une forte inhibition comme précédemment dans le vin blanc. À pH 2,8 et 3,0, aucune souche ne survit, dès 48 h. À pH 3,3, toutes les populations régressent continuellement dès 48 h et jusqu'à 14 jours, pour devenir toutes très faibles, voire imperceptibles. À ce pH, les souches du groupe VR ont un comportement similaire à celui qui avait été noté dans le vin blanc, mais celles du groupe VB se comportent différemment. En effet, alors qu'elles ne survivent pas dans le vin rouge, elles avaient repris une croissance significative

dans le vin blanc, jusqu'à atteindre, après 14 jours, quasiment le même niveau de population qu'au moment de l'inoculation. Il semble donc que les deux types de vins ont des impacts différents, qui ne sont pas liés uniquement au pH.

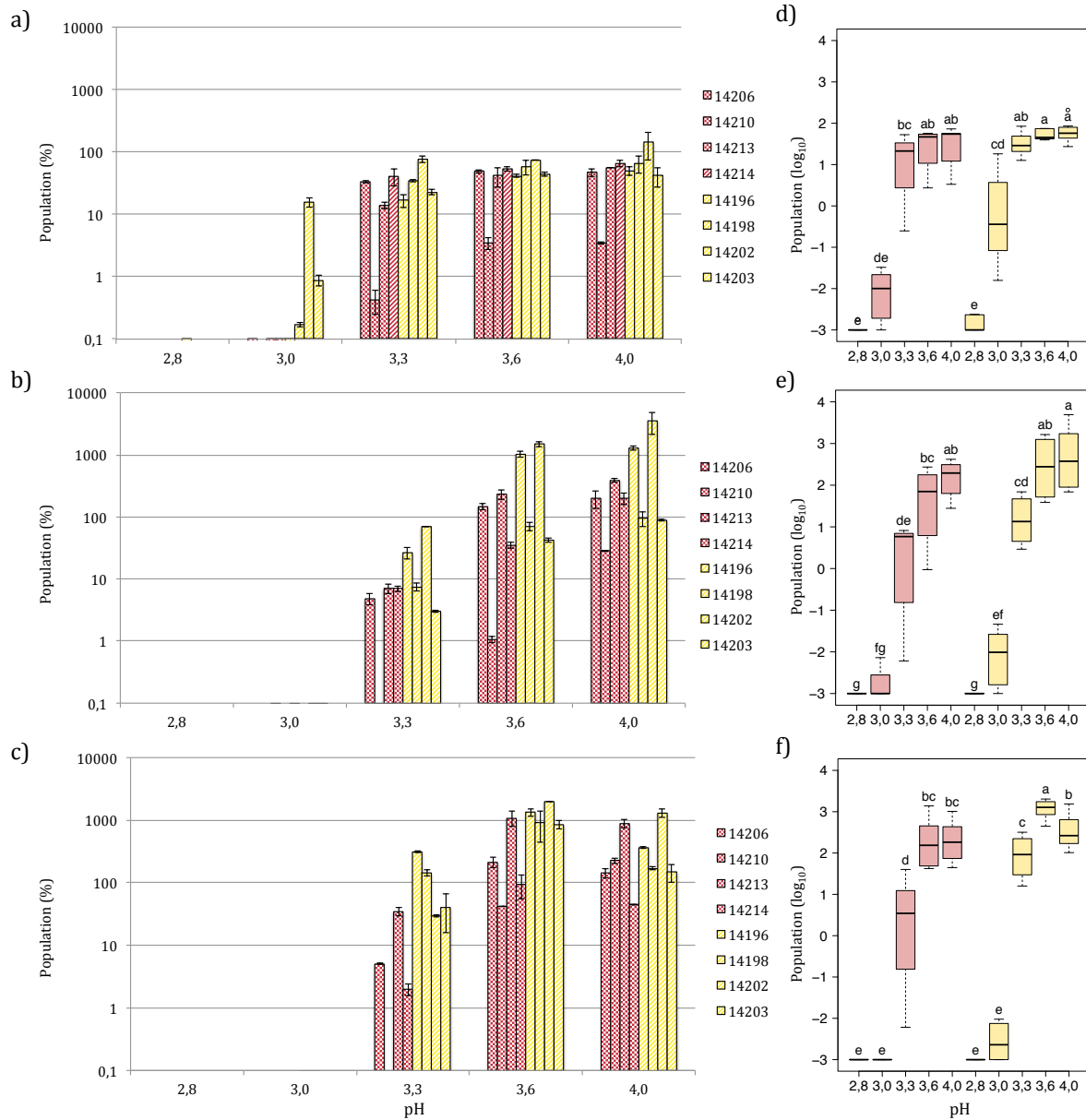


Figure 37 : Survie des souches des groupes VB et VR dans un vin blanc en fonction du pH.

Quatre souches de chaque groupe, VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin blanc (N° 1), ajusté à pH 2,8 à 4,0. Leurs populations ont été suivies par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours et une comparaison statistique des résultats obtenus pour les deux groupes de souches a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

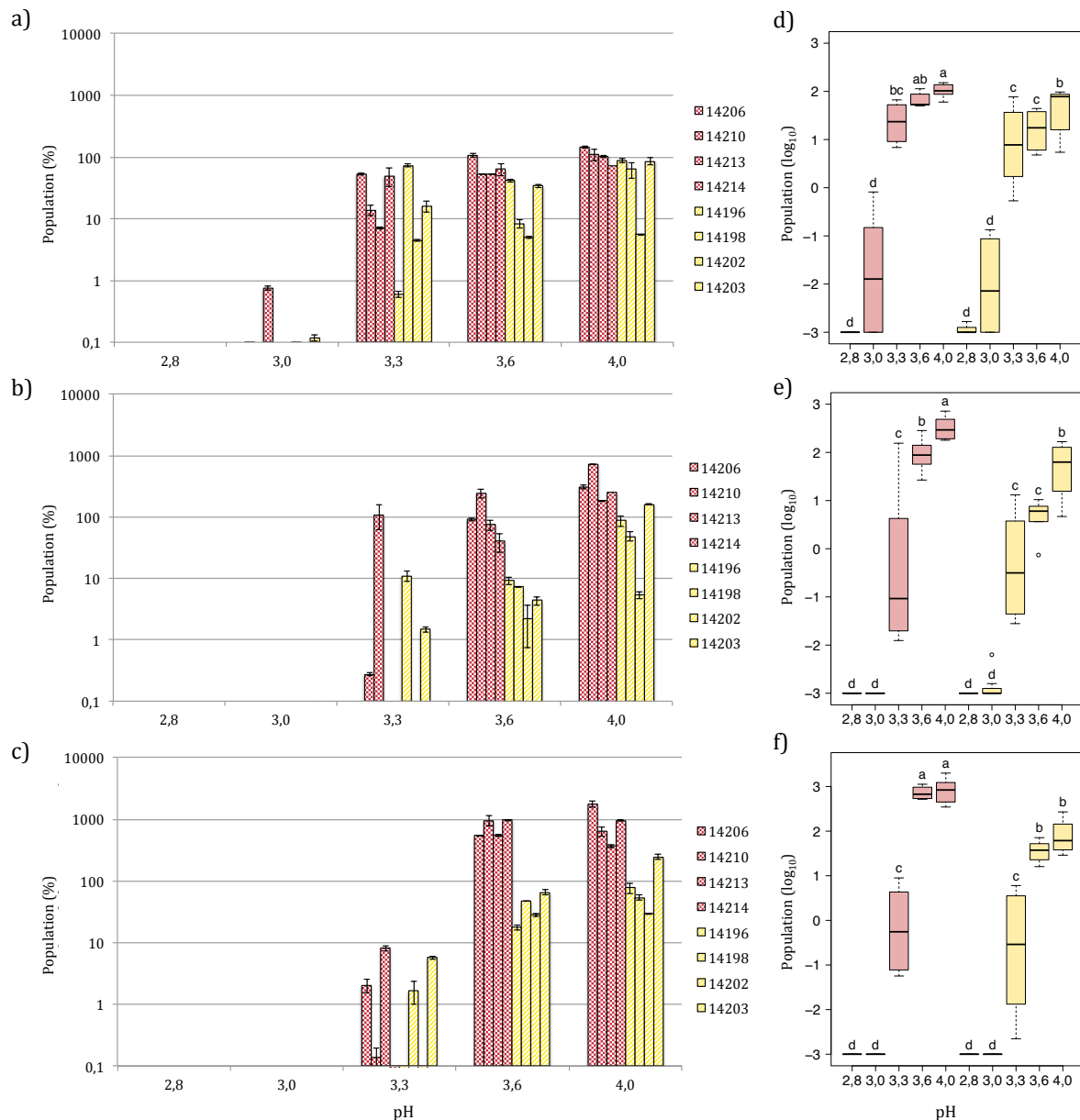


Figure 38 : Survie des souches des groupes VB et VR dans un vin rouge en fonction du pH.

Quatre souches de chaque groupe, VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin rouge (N° 3), ajusté à pH 2,8 à 4,0. Leurs populations ont été suivies par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours (c) et une comparaison statistique des résultats obtenus pour les deux groupes de souches a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

III.2. Influence des polyphénols dans le vin

Dans la mesure où les essais réalisés dans le moût ont montré que l'effet le plus significatif avait été obtenu avec l'extrait de tannins T3, seul celui-ci a été testé dans le vin. Comme précédemment, les cellules des deux groupes VB et VR ont été testées dans les deux types de vins blanc et rouge, mais cette fois-ci ajustés à pH 4,0 et additionnés de 0, 1, 2,5 ou 5 g/L d'extrait T3.

La Figure 39 présente le comportement des souches inoculées dans un vin blanc de cépage Chardonnay en présence de différentes concentrations d'extrait polyphénolique T3. En l'absence de polyphénols ajoutés, les deux types de souches ont des comportements différents. Celles du groupe VR sont fortement inhibées dès 48 h et jusqu'à 7 jours et ne retrouvent leur population d'inoculation qu'après 14 jours, alors que celles du groupe VB sont peu inhibées après 48 h et se développent bien dès 7 jours. Ce comportement suit la même tendance que ce qui avait été observé précédemment dans ce type de vin à pH 4, bien que la différence entre les deux groupes de souches soit encore plus importante dans ce cas. Il est possible que cette différence soit due à une évolution du vin entre les deux essais. En présence d'extrait T3, toutes les cellules ont été fortement inhibées et de façon proportionnelle à la quantité ajoutée. Avec la plus faible concentration (1 g/L), les souches ont un comportement assez hétérogène après 48 h ou 7 jours. Certaines maintiennent un niveau de population proche du niveau d'inoculation (principalement celles du groupe VB), alors que d'autres sont fortement inhibées. Après 14 jours, elles ont des comportements assez similaires et retrouvent presque toutes une population égale ou supérieure au taux d'inoculation, mais ces niveaux sont toujours nettement plus faibles qu'en l'absence de polyphénols. En présence de 2,5 ou 5 g/L, elles sont toutes très fortement inhibées, à l'exception d'une seule souche du groupe VB qui, avec 2,5 g/L, parvient à retrouver sa population initiale après 14 jours. Globalement, cet essai montre que toutes les souches sont sensibles à l'ajout de cet extrait T3. Les inhibitions mesurées sont nettement plus importantes que celles qui avaient été observées dans le moût, ce qui semble normal, car le stress lié aux polyphénols s'ajoute cette fois-ci à celui causé par la forte teneur en alcool. Une différence de comportement est parfois observée entre les souches des deux groupes, mais elle peut être due à une mauvaise adaptation des souches du groupe VR à ce type de vin, comme le montrent les essais réalisés en l'absence de polyphénols.

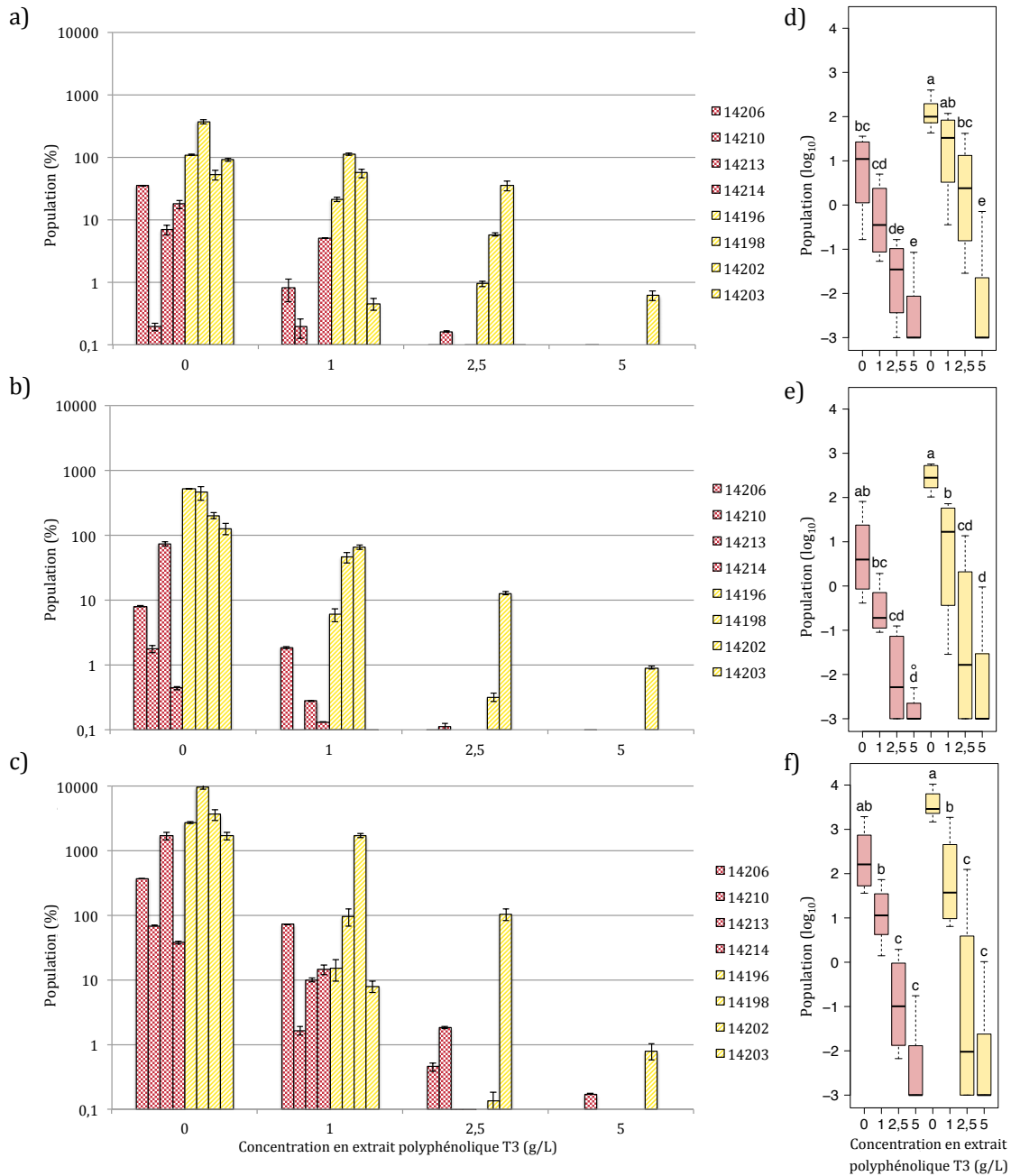


Figure 39 : Effet de l'extrait de polyphénols T3 sur les souches des groupes VB et VR dans un vin blanc.

Quatre souches de chaque groupe, VB (en jaune) et VR (en rouge) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin blanc (N° 1) auquel ont été ajoutées différentes concentrations de l'extrait polyphénolique T3 (1 à 5 g/L), ainsi qu'un témoin sans ajout. Leurs populations ont été suivies par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours et une comparaison statistique des résultats obtenus pour les deux groupes de souches a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

Lorsque des essais similaires sont réalisés dans le vin rouge (Pinot noir), une situation assez différente est observée (Figure 40). Premièrement, en absence de polyphénols ajoutés, les souches du groupe VR ne sont pas inhibées comme cela était noté dans le vin blanc. Après un premier déclin de leur population, comme cela est observé classiquement dans le vin après 48 h, elles se développent fortement et atteignent des populations plus de 10 fois supérieures au taux d'inoculation au bout de 14 jours. Les souches du groupe VB sont plus fortement inhibées après 48 h, mais après 14 jours elles retrouvent quasiment le niveau d'inoculation. Deuxièmement, lorsque l'extrait T3 est ajouté, il y a une grande différence de comportement entre les souches des deux groupes. En présence de 1 g/L, celles du groupe VR sont encore capables de se multiplier et d'atteindre des populations supérieures au taux d'inoculation après 14 jours, alors que dans les mêmes conditions, celles du groupe VB sont à peine détectables. À 2,5 et 5 g/l, les souches du groupe VR sont inhibées, mais leurs populations restent mesurables et non négligeables, alors que celles de l'autre groupe disparaissent totalement. Il est probable que les polyphénols naturellement présents dans ce vin ont eu un effet inhibiteur qui s'additionne à celui de l'extrait T3 ajouté, ce qui explique la plus forte inhibition des cellules du groupe VB dans ce vin, par rapport au vin blanc testé précédemment. Cependant, l'effet produit sur les souches du groupe VR semble inverse. En effet, ces souches résistent mieux à ce type de vin, même lorsqu'il est supplémenté en polyphénols. L'ensemble de ces résultats suggère, d'une part, que les souches du groupe VR sont bien plus résistantes à la présence de polyphénols dans le vin que celles du groupe VB, et d'autre part, que le vin rouge pourrait contenir des nutriments ou d'autres facteurs qui peuvent être utilisés par les souches du groupe VR pour survivre et se développer dans ce type de vin, contrairement à celles du groupe VB. Enfin, ces résultats montrent que l'inhibition liée aux polyphénols est bien réelle dans le vin, alors qu'elle est difficilement perceptible dans le moût. Il semble donc que les souches d'*O. oeni* n'y sont sensibles que lorsque leur action est combinée à celle liée à la teneur en alcool.

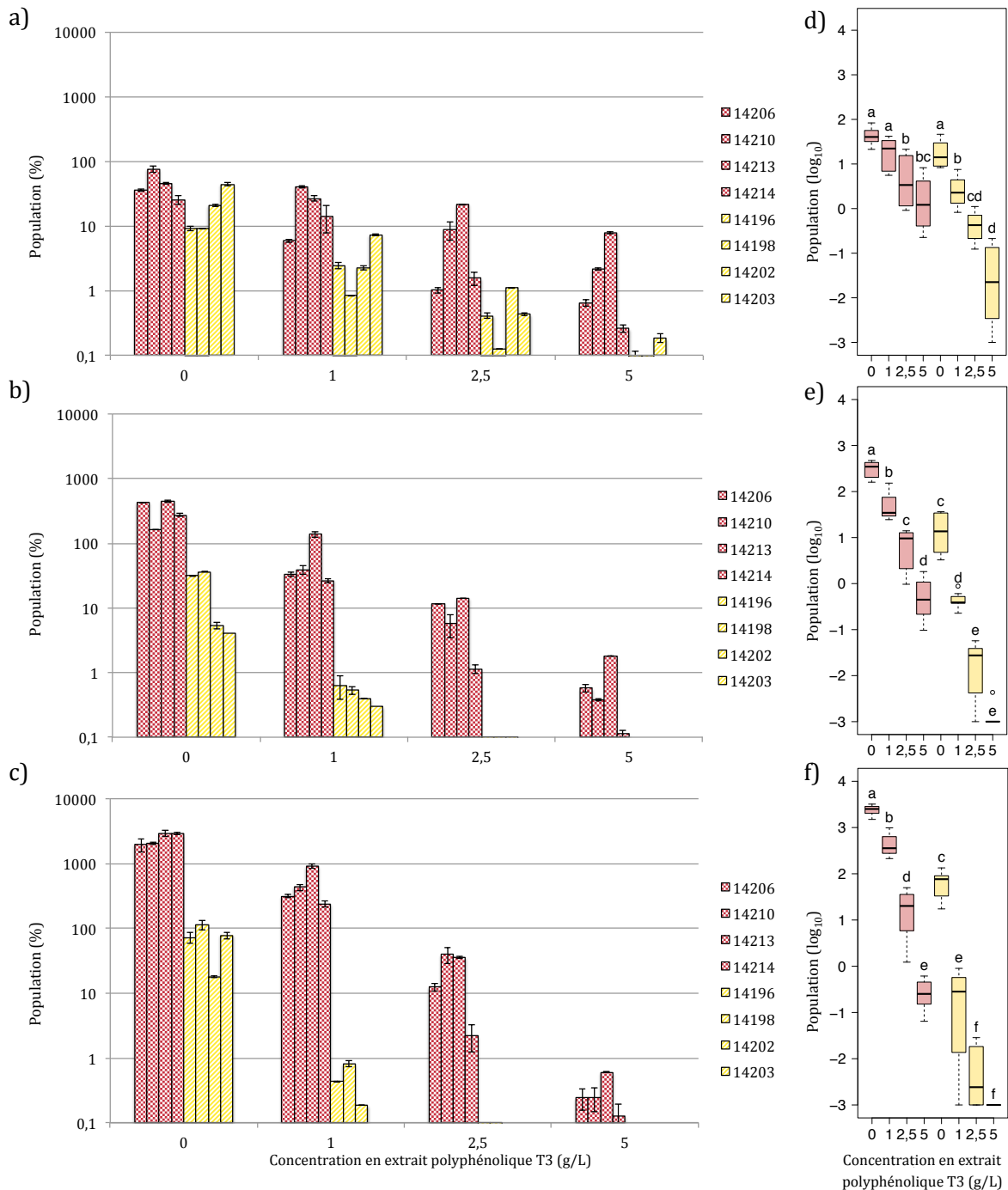


Figure 40 : Effet de l'extrait de polyphénols T3 sur les souches des groupes VB et VR dans un vin rouge.

Quatre souches de chaque groupe, VB (en jaune) et VR (en rouge) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin rouge (N° 3) auquel ont été ajoutées différentes concentrations de l'extrait polyphénolique T3 (1 à 5 g/L), ainsi qu'un témoin sans ajout. Leurs populations ont été suivies par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours (c) et une comparaison statistique des résultats obtenus pour les deux groupes de souches a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

IV. Influence de différentes fractions de l'extrait T3 sur la survie

Pour mieux identifier les polyphénols de l'extrait T3 qui sont responsables de l'inhibition observée dans le vin, cet extrait a été fractionné par une extraction liquide/liquide afin de séparer les polyphénols selon leur affinité pour un solvant organique et l'eau. Les deux fractions aqueuses et organiques obtenues ont été lyophilisées afin d'éliminer les traces éventuelles de solvant. La fraction organique contient les polyphénols de faible Dpm, pour la plupart monomériques et la fraction aqueuse les polyphénols de haut Dpm.

Ces deux fractions ont été testées sur deux souches des groupes VB et VR dans un moût blanc (6 % éthanol et pH 4) et les résultats de leur survie sont présentés dans la Figure 41.

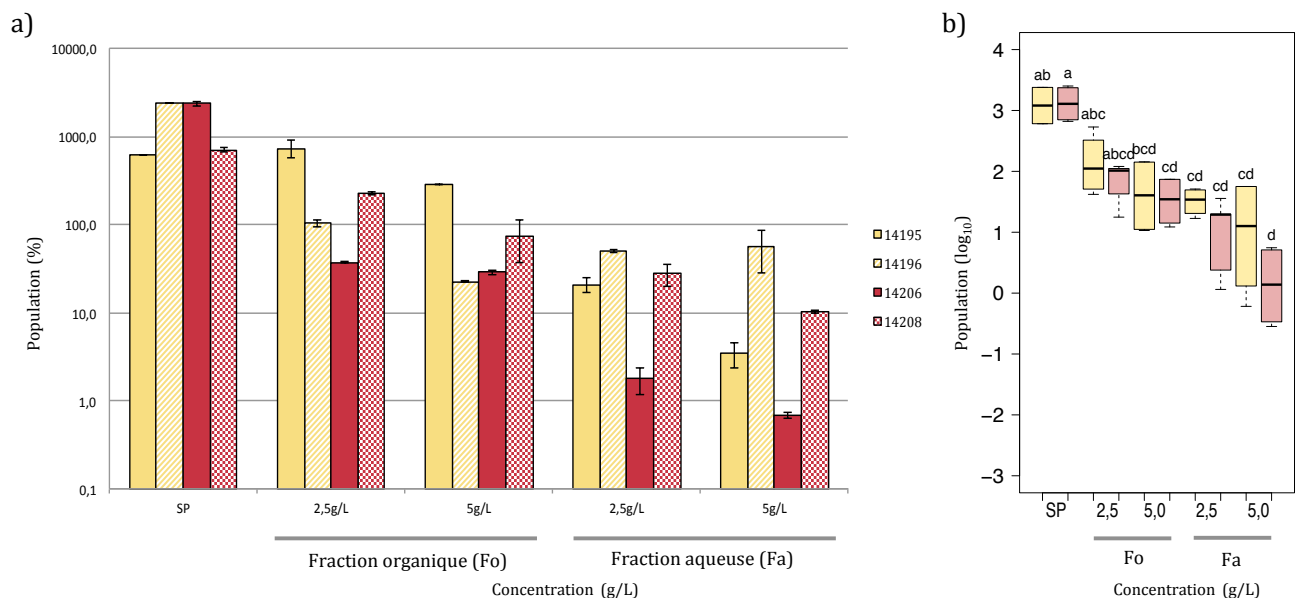


Figure 41 : Effet de deux fractions issues de T3 sur la survie de souche du groupe VB et VR.

Les souches issues des deux groupes génétiques distincts VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un milieu jus de raisin en présence de 6 % d'alcool, un pH 4, avec différents fractions (organique : Fo et aqueuse : Fa) issues de l'extrait T3 à des concentrations de 2,5 et 5 g/L ou sans ajout de polyphénols (SP). Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 7 jours (a) et une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée (b). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés avec le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

Après 7 jours, l'étude de la survie des souches montre que la fraction organique à une concentration de 2,5 g/L n'a aucun effet significatif sur les souches des deux groupes. Lorsque la concentration de la fraction organique est augmentée à 5 g/L, une diminution significative de la survie des souches VR est observée tandis qu'il n'y a aucun changement significatif pour les

souches VB. Néanmoins, l'effet de cette fraction a un effet variable selon la souche au sein même d'un groupe. En effet, à 5 g/L la souche 14 195 est en croissance avec un taux de survie supérieur à 100 % alors que la souche 14 196 est inhibée avec un taux de survie d'environ 30 % la population inoculée.

La fraction aqueuse a un effet très important sur la survie de l'ensemble des souches dès 2,5 g/L. Le log₁₀ du taux de survie passe de 3 en absence de polyphénols à environ 1 pour la fraction aqueuse à des concentrations de 2,5 g/L et 5 g/L.

Une précipitation successive au chloroforme mise en place par (Shevchenko et al., 1996; Saucier et al., 2001) de la fraction aqueuse précédemment obtenue a ensuite été effectuée afin d'affiner la sélection de polyphénols ayant l'impact le plus important sur les souches. Les résultats de l'effet des quatre fractions obtenues sur deux souches du groupe VB (14 195 et 14 196) sont présentés dans la Figure 42. Les fractions F1 et F4 à 2,5 g/L, 48 h après inoculation n'ont aucun effet significatif sur la survie des souches tandis que les autres fractions (F2 et F3) réduisent la survie des souches dès 2,5 g/L et de manière plus importante à 5 g/L. On remarque qu'après 7 jours, l'ensemble des fractions a un effet important sur la survie. Le taux de survie est inférieur à 100 % de la population inoculée pour toutes les fractions sauf F4. Le fractionnement des polyphénols par cette technique permet une séparation selon le Dpm, cependant, la majorité des polyphénols composants la fraction aqueuse précipite dès le premier ajout de chloroforme. La composition de cette fraction aqueuse semble être très homogène en terme de Dpm d'où la récupération importante de fraction F1. La quantité de fractions F2 F3 et F4 est très inférieure et limite la possibilité de test à effectuer notamment sur d'autres souches, dont celles du groupe VR.

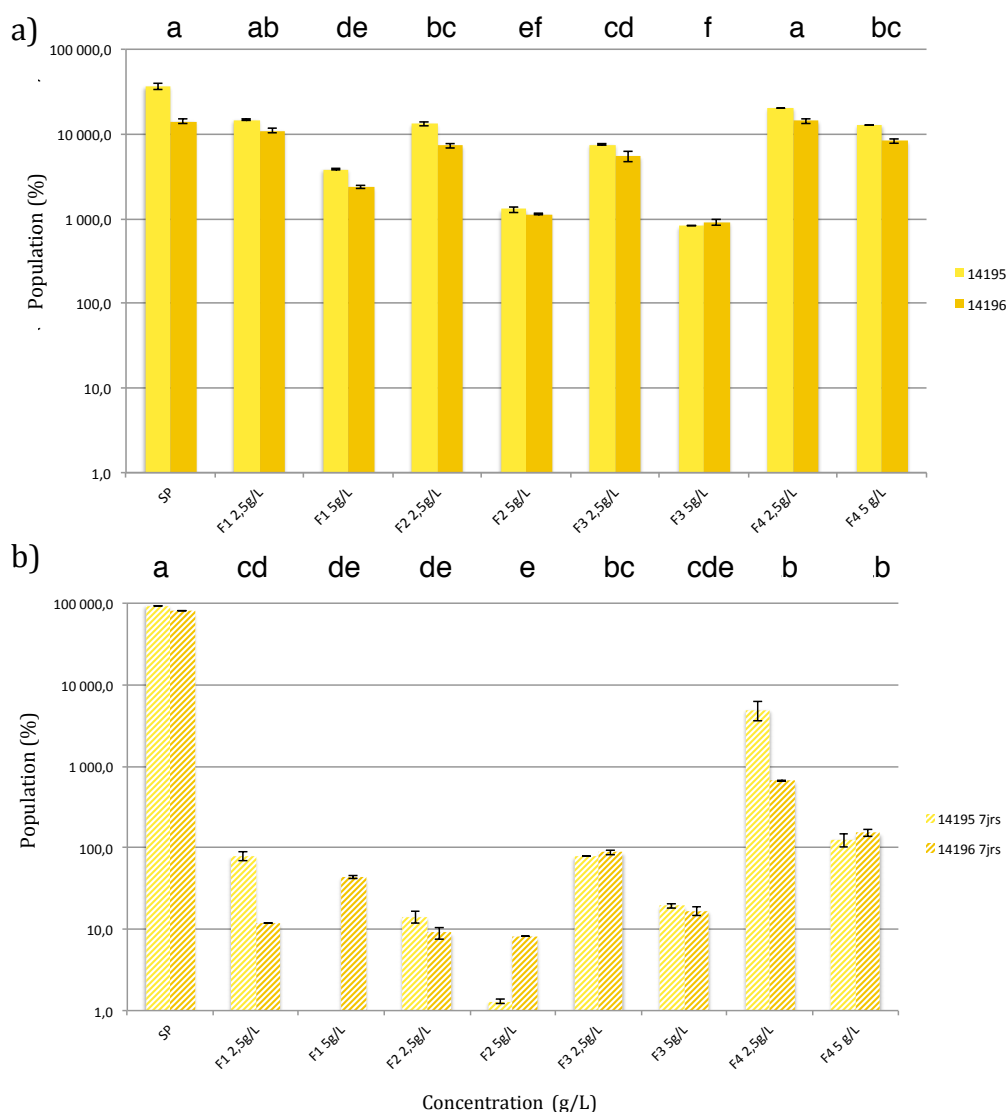


Figure 42 : Effet de différentes fractions de la fraction aqueuse de l'extrait T3 sur la survie de souches VB.

Les souches 14 195 et 14 196 ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un milieu jus de raisin en présence de 6 % d'alcool, un pH 4, avec différentes fractions (F1, F2, F3 et F4) issues de la précipitation successive au chloroforme de la fraction aqueuse de l'extrait T3 à des concentrations de 2,5 et 5 g/L ou sans ajout de polyphénols (SP). Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a) et à 7 jours (b) et une comparaison statistique entre les conditions pour les deux souches du groupe VB a été effectuée. Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. La significativité des données a été testée par un test de Kruskal Wallis avec un α de 0,05 avec le logiciel R.

V. Observation en microscopie électronique des cellules exposées aux polyphénols

Plusieurs études ont montré que les cellules bactériennes sensibles aux polyphénols ont des caractéristiques physiologiques observables en microscopie électronique, comme la destruction de leur paroi et de leur membrane plasmique ou l'apparition de zones hétérogènes dans le cytoplasme (García-Ruiz et al., 2012). Dans la mesure où nos résultats ont montré que les cellules du groupe VR sont plus résistantes à la présence de ces composés que celles de l'autre groupe, nous avons réalisé différents types d'observations microscopiques pour déterminer si l'exposition aux polyphénols avait des effets observables et différents selon les souches.

V.1. Essai d'observation par coloration négative

Un premier essai d'observation a été réalisé par coloration négative, sans traitement physique. Les avantages de cette technique sont sa rapidité de mise en œuvre et le fait qu'elle ne perturbe pas ou ne modifie pas les interactions possibles entre la cellule bactérienne et la matrice dans laquelle elle se trouve, dans la mesure où il n'y a pas de traitement physique de l'échantillon, outre une centrifugation. Plusieurs souches des deux groupes VB et VR ont étéensemencées dans un vin rouge supplémenté avec 1 g/L d'extrait T3, puis elles ont été observées au MET après contraste à l'acétate d'uranyle. La Figure 43 présente les résultats pour les souches 14 196 (groupe VB) et 14 206 (groupe VR). Les cellules bactériennes apparaissent blanches, mais le contrastant, qui est dense aux électrons, réagit fortement avec les composés du vin rouge utilisé et les polyphénols ajoutés. Il en résulte un phénomène de masquage qui ne permet pas d'observer correctement l'aspect des cellules. Cette technique n'a donc pas pu être utilisée par la suite.

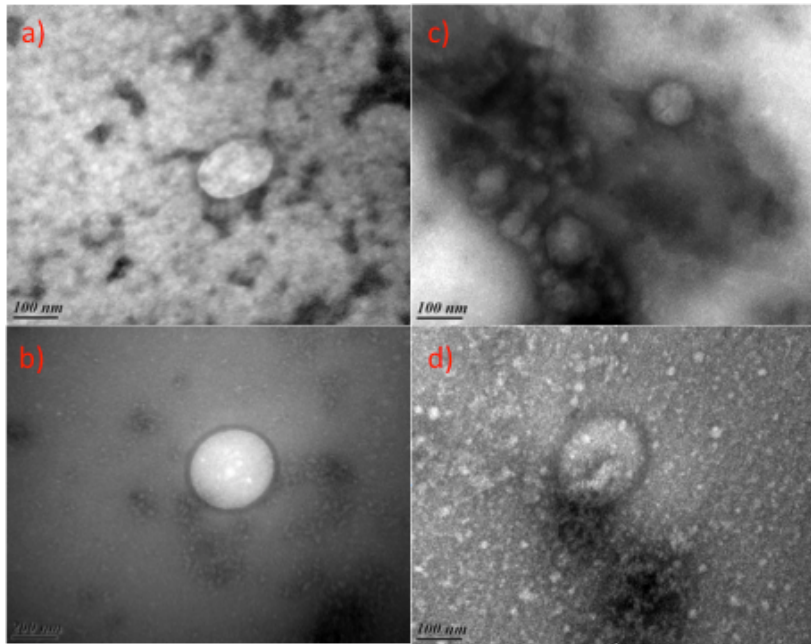


Figure 43 : Observations de cellules au MET après coloration négative.

Les souches 14 196 (a e b) et 14 206 (c et d) ont été ensemencées dans du vin rouge (N° 3) additionné de 1 g/L d'extrait T3. Les cellules ont été déposées sur grille, traitées avec de l'acétate d'uranyle à 3 % et observées au MET.

V.2. Observations au MET après exposition des cellules aux polyphénols

V.2.1. Contrôles de la survie des cellules dans les conditions de tests

Les résultats d'observation par coloration négative n'étant pas satisfaisants, de nouveaux essais ont été réalisés et les observations ont été faites en mode haut contraste. Une souche de chaque groupe VB (14 196) et VR (14 213) a été exposée pendant 7 jours dans un vin blanc ou un vin rouge, avec ou sans ajout d'extraits polyphénoliques. Leurs taux de survie ont été mesurés dans les différentes conditions testées au moment de l'observation en microscopie comme indiqué dans la Figure 44. Les résultats étaient conformes aux résultats décrits dans les paragraphes précédents, à savoir que les souches du groupe VR résistent mieux à l'ajout d'extrait T3 dans le vin que celles du groupe VB, et en particulier lorsque les tests sont réalisés dans un vin rouge. Pour contrôle, nous avons également observé les cellules exposées à l'extrait T1 ajouté dans un vin blanc, condition qui n'est pas particulièrement stressante pour les souches des deux groupes, car elles ont un taux de survie proche du taux d'inoculation après 7 jours (Figure 44).

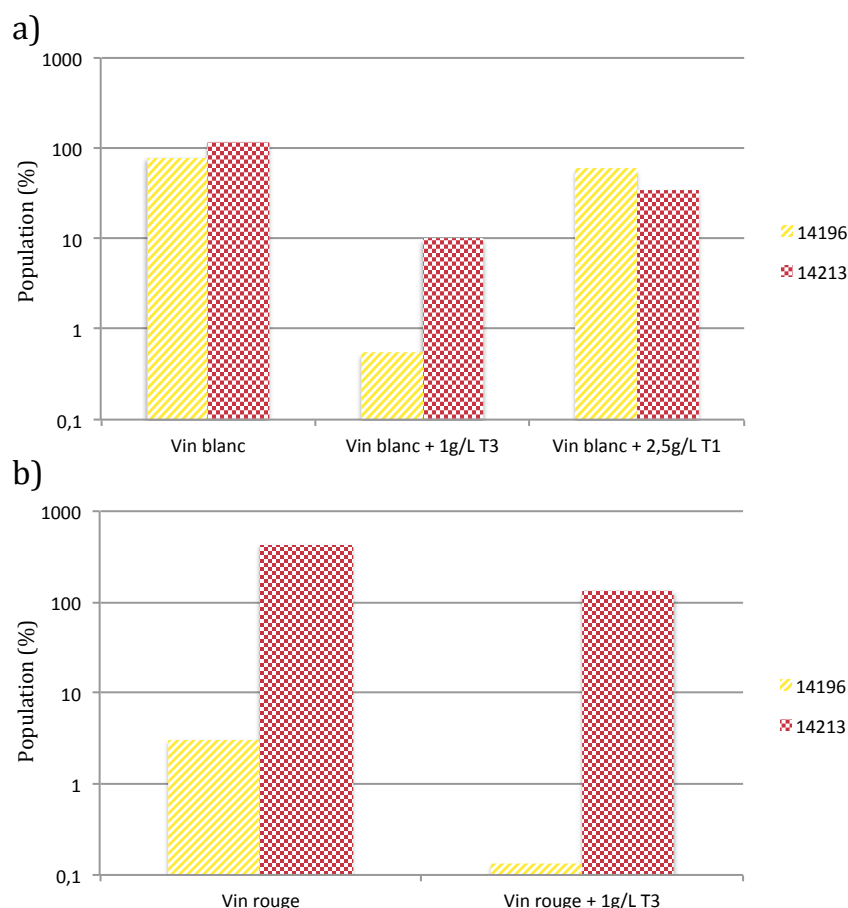


Figure 44 : Survie des souches 14 196 et 14 213 des différentes conditions observées au MET.

Les souches 14 196 et 14 213 issues des deux groupes génétiques distincts, respectivement VB (en **jaune**) et VR (en **rouge**) ont été inoculées dans deux vins : blanc (N° 1) et rouge (N° 3) auquel a été ajouté différents extraits polyphénoliques : T1 à 2,5 g/L et T3 à 1 g/L. Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé après 7 jours et les cellules ont été récoltées pour l'observation au MET.

V.2.2. Observations après exposition dans un vin blanc supplémenté ou non en polyphénols

La Figure 45 présente les résultats obtenus pour la souche 14 196 (groupe VB) dans un vin blanc seul ou additionné de 2,5 g/L d'extrait T1, ou de 1 g/L d'extrait T3. Dans le vin blanc, cette souche a un taux de survie de 80 % (Figure 44). Les cellules ont un cytoplasme uniforme, une paroi épaisse, peu dense aux électrons (zone claire) et elles sont entourées d'une structure irrégulière correspondant vraisemblablement à une capsule. En présence de l'extrait T1, cette souche présente encore un bon taux de survie (60 %, Figure 44), mais elle apparaît différemment au microscope. Il semble que la capsule a disparu ou qu'elle soit très amincie et l'intérieur des cellules est très opaque, ce qui indique une nette densification du cytoplasme aux

électrons. Avec l'extrait T3, des amas denses aux électrons apparaissent à l'extérieur des cellules et souvent liés à celles-ci.

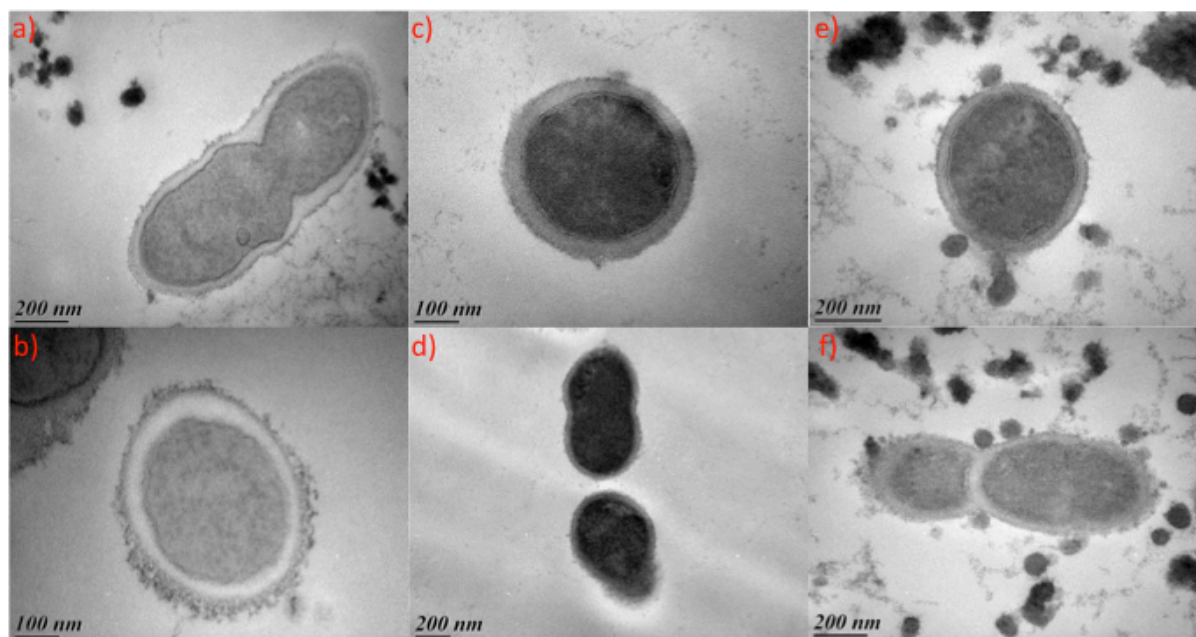


Figure 45 : Observation de la souche 14 196 (VB) après exposition dans un vin blanc en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 196 a étéensemencée dans du vin blanc (N° 1) dont le pH a été rectifié (pH 3,58) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b), avec 2,5 g/L d'extrait T1 ajoutés (c et d) et avec 1 g/L de T3 ajouté (e et f). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

Ces amas sont de taille variable, pouvant aller de 10 à 50 nm. Ces amas ont été observés systématiquement lorsque cette souche a été traitée en présence de l'extrait T3, et jamais dans d'autres conditions. Par conséquent, il est probable qu'ils résultent de l'interaction entre les polyphénols de cet extrait et les cellules. En dehors de ces amas, les observations indiquent que les cellules ont des morphologies assez semblables à celles observées dans le vin blanc seul, ce qui serait logique dans la mesure où elles ont bien toléré ces conditions de test (Figure 44).

L'aspect de la souche 14 213, appartenant au groupe VR, a été étudié dans les mêmes conditions de test (Figure 46). Comme constaté précédemment pour la souche 14 196, cette souche a bien résisté à l'inoculation dans le vin blanc seul, puisqu'elle a atteint 120 % de la population initiale après 7 jours (Figure 44). Néanmoins, elle apparaît avec une morphologie qui est sensiblement différente. Sa paroi semble nettement moins épaisse que celle de la souche 14 196, sa capsule est également plus visible et son cytoplasme apparaît plus irrégulier, avec des zones plus denses que d'autres. En présence de 1 g/L d'extrait T1, bien que sa survie soit moindre (35 %), la morphologie de cette souche est sensiblement la même, à l'exception de sa capsule, qui est

encore plus visible et fait apparaître de longs filaments. En présence de 2,5 g/L de l'extrait T3, la survie de la souche est encore moindre (10 %) et son aspect est très similaire à celui observé en avec l'extrait T1, avec encore une capsule très visible. Il est intéressant de noter que les amas extracellulaires observés avec la souche 14 196 ne sont pas visibles dans ce cas, ce qui suggère qu'ils résultent d'une interaction entre des polyphénols et des composés extracellulaires spécifiques de la souche 14 196. Si ces composés sont des polysaccharides de capsule, ils doivent avoir une composition différente de ceux de la souche 14 213

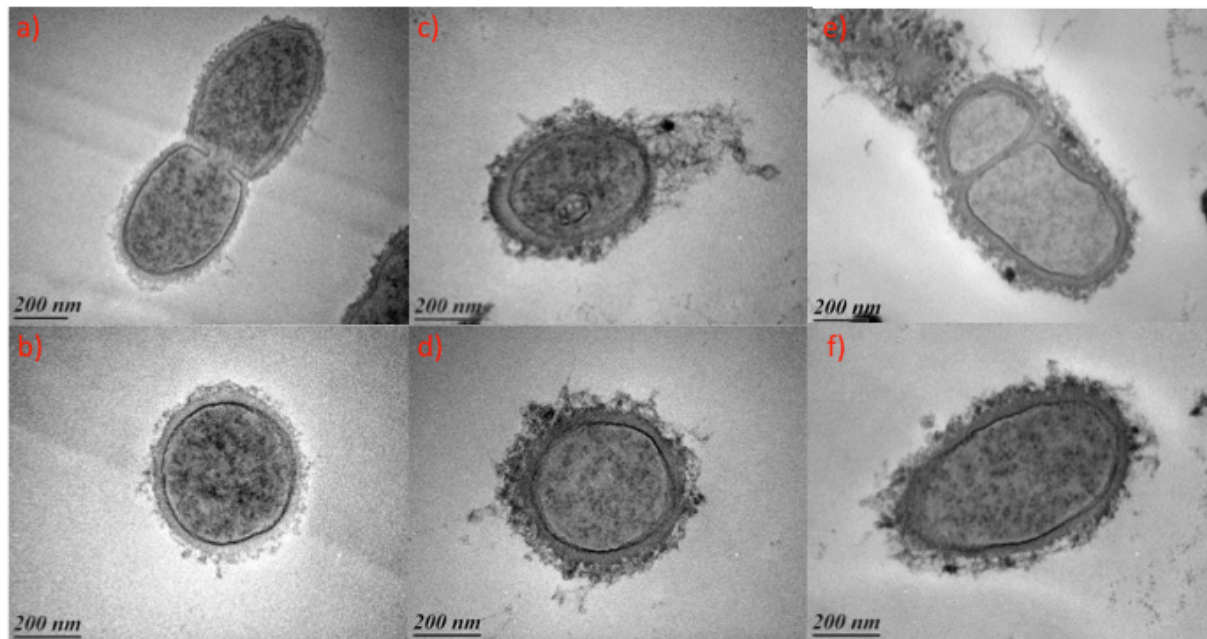


Figure 46 : Observation de la souche 14 213 (VR) après exposition dans un vin blanc en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 213 a été ensemencée dans un vin blanc (N° 1) dont le pH a été rectifié (pH 3,58) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b), avec 2,5 g/L d'extrait T1 ajoutés (c et d) et avec 1 g/L de T3 ajouté (e et f). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

V.2.3. Observation après exposition dans un vin rouge supplémenté ou non en polyphénols

Le comportement et l'aspect des deux souches 14 196 et 14 213 ont également été analysés après exposition dans un vin rouge de Pinot noir avec ou sans ajout d'extrait T3 à 1 g/L (Figure 47 et Figure 48). Alors qu'elles avaient un comportement relativement similaire dans les essais réalisés en vin blanc, les 2 souches ont réagi très différemment à l'inoculation dans le vin rouge, ce qui est en accord avec les résultats des paragraphes précédents. Dans le vin seul ou supplémenté en extrait T3, la souche 14 213 a bien survécu et s'est même développée pour

atteindre, respectivement, 430 et 130 % de la population initiale. À l'inverse, la souche 14196 n'a résisté à aucune des deux conditions, avec un taux de survie inférieur à 10 % dans le vin seul et proche de 0,1 % en présence de l'extrait T3 (Figure 44).

Observées en MET, les cellules de la souche 14 196 (VB) ont un cytoplasme très hétérogène, avec des zones très claires, qui sont caractéristiques de cellules mortes. Leurs parois et membranes sont également désorganisées, avec des zones diffuses. La souche 14 213, elle, présente une organisation tout à fait similaire à celle qui était observée dans le vin blanc, à savoir un cytoplasme dense et hétérogène, mais sans aucune zone claire comme observée chez la souche 14 196, et surtout une capsule très importante qui enveloppe la cellule. Les capsules étant impliquées dans la résistance des cellules au stress, il est possible qu'elles confèrent à cette souche sa meilleure résistance vis-à-vis des polyphénols contenus dans ce vin rouge et l'extrait T3.

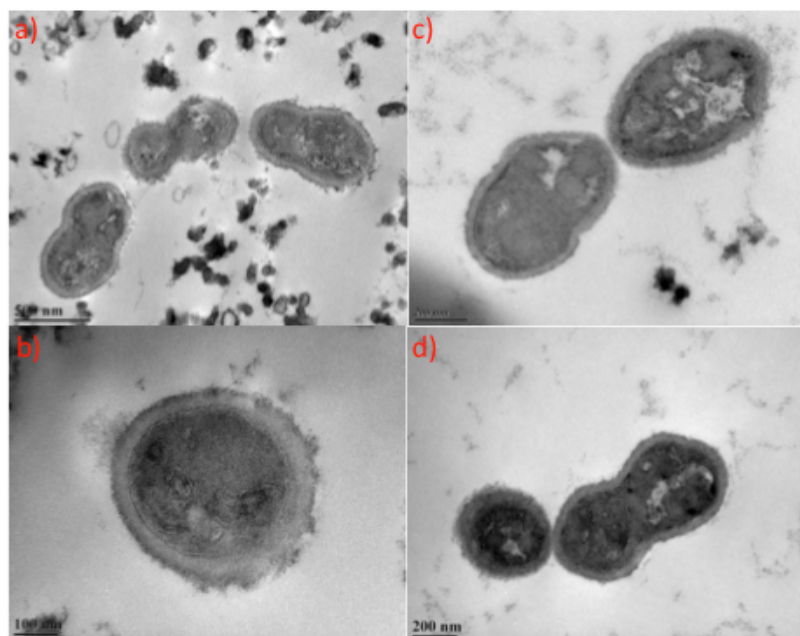


Figure 47 : Observation de la souche 14 196 (VB) après exposition dans un vin rouge en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 196 a étéensemencée dans un vin rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH 3,6) dans différentes conditions: sans ajout de polyphénols (a et b) ou avec 1 g/L d'extrait polyphénolique T3 (c et d). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

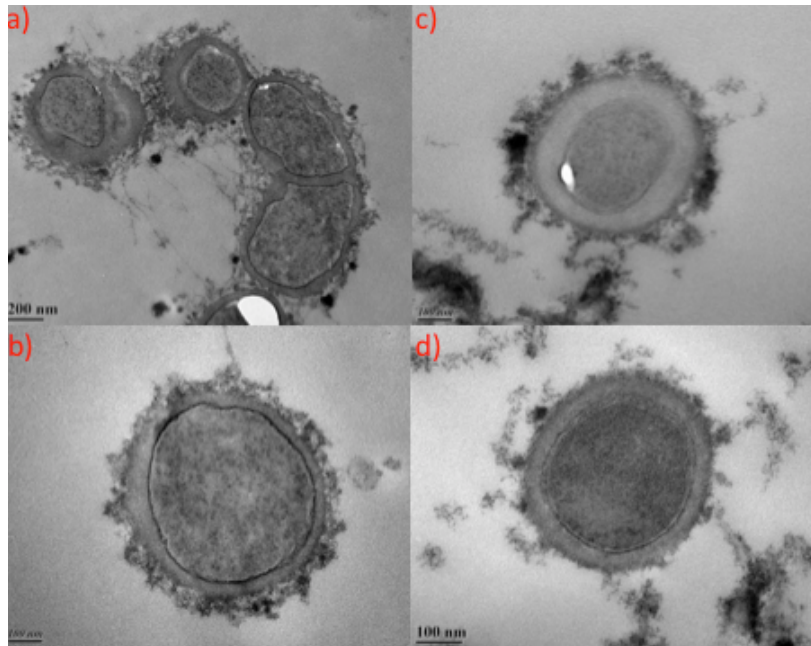


Figure 48 : Observation de la souche 14 213 (VR) après exposition dans un vin rouge en présence ou absence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 213 a étéensemencée dans un vin rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH 3,6) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b) ou avec 1 g/L d'extrait polyphénolique T3 (c et d). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

V.3. Observations après marquage spécifique des polysaccharides

Pour déterminer si la capsule observée chez la souche 14 213 est de nature polysaccharidique, les préparations de cellules utilisées pour les observations précédentes ont été traitées par une technique rapide, la « réaction de Thierry » ou test PATAg (Thiery, 1967), qui permet d'effectuer un contraste supplémentaire en marquant spécifiquement les polysaccharides. Ce test a auparavant été utilisé dans d'autres études pour rechercher la synthèse d'EPS ou CPS (Andrés-Barrao et al., 2012) (Andrés-Barrao et al., 2015). Les résultats sont présentés dans les Figure 49 à Figure 52.

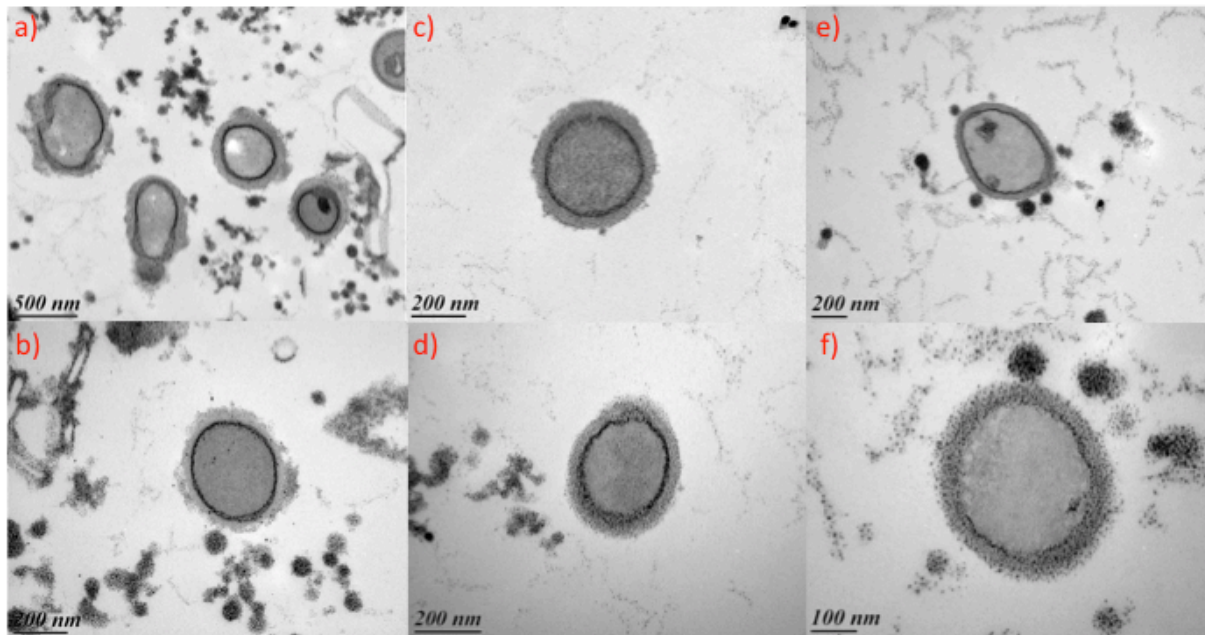


Figure 49 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 196 (VB) dans un vin blanc et en présence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 196 a été ensemencée dans un vin blanc (N° 1) dont le pH a été rectifié (pH 3,58) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b), avec 2,5 g/L d'extrait T1 ajoutés (c et d) et avec 1 g/L de T3 ajouté (e et f). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont subi la réaction de Thiery et été observées au MET en mode haut contraste.

La souche 14 196 appartenant au groupe VB ensemencée dans un vin blanc seul après la réaction de Thiery présente sur la partie externe de ces cellules des complexes sphériques denses aux électrons. La partie au-delà de la membrane (zone la plus dense aux électrons) comprenant la paroi et une partie plus diffuse et irrégulière identifiée comme la capsule serait donc composée de polysaccharides.

Dans la condition avec ajout de l'extrait T1, on observe une structure plus compacte et homogène avec des complexes polysaccharidiques au niveau de la membrane et de la paroi. Enfin, avec l'ajout de l'extrait T3, on peut voir apparaître des complexes par la réaction de Thiery au niveau des amas circulaires, denses aux électrons précédemment observés dans la Figure 45 e et f. On peut donc penser que soit il s'agit de polysaccharides dont l'ajout d'extrait T3 a provoqué un changement global de la charge à la surface de la bactérie et en a modifié l'organisation soit la réaction de Thiery n'est pas spécifique des polysaccharides.

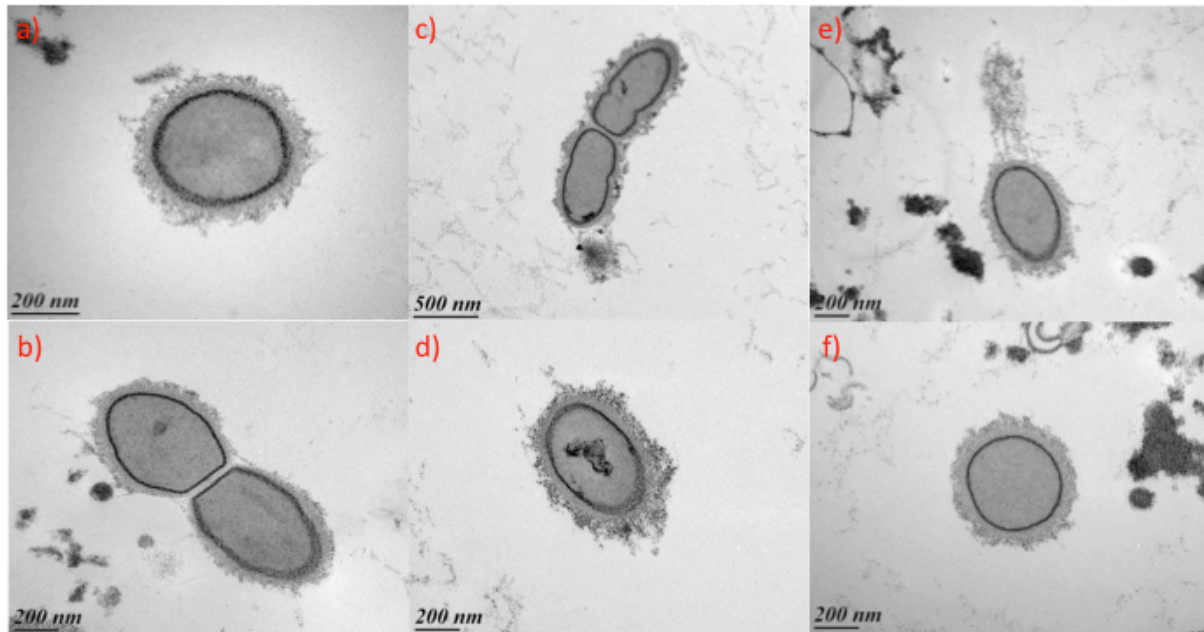


Figure 50 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 213 (VR) dans un vin blanc et en présence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 123 a été ensemencée dans un vin blanc (N° 1) dont le pH a été rectifié (pH 3,58) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b), avec 2,5 g/L d'extrait T1 ajoutés (c et d) et avec 1 g/L de T3 ajouté (e et f). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont subi la réaction de Thiery et été observées au MET en mode haut contraste.

La réaction de Thiery a également été effectuée sur la souche 14 213 appartenant au groupe VR et on observe dans le vin blanc seul (Figure 50 a et b), des complexes très denses au niveau de la membrane puis de la partie plus externe comprenant le peptidoglycane et des prolongements plus diffus. Dans le cas de la photographie b, on identifie un prolongement relié à un amas circulaire ayant réagi avec la réaction de Thiery. La photographie (a) présente une cellule de la souche 14 213 à la surface très diffuse et pouvant être qualifiée de « chevelue ».

Cette structure apparaît également dans les conditions avec ajout d'extrait polyphénolique (T1 et T3) avec dans certains cas des projections de la cellule située dans le champ vers probablement une autre cellule contenue dans un autre plan.

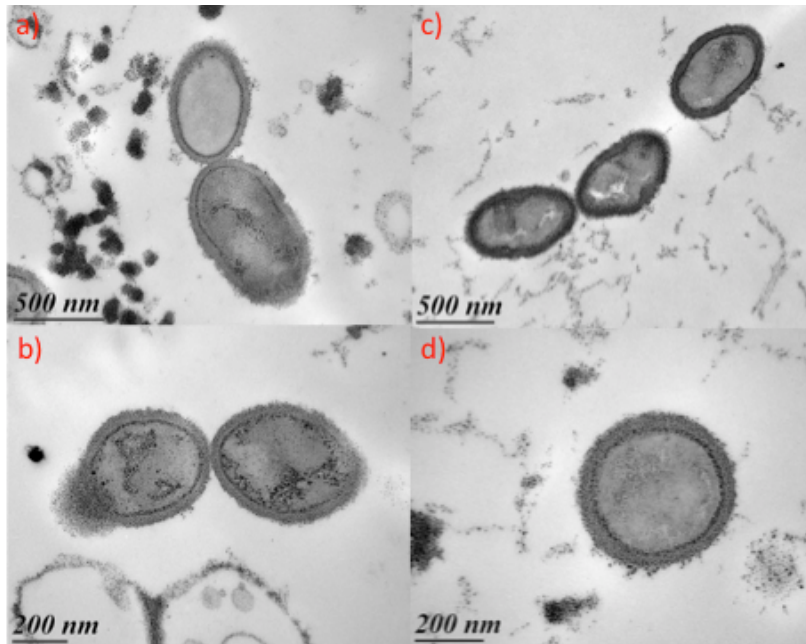


Figure 51 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 196 (VB) dans un vin rouge et en présence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 196 a étéensemencée dans un vin rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH3,6) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b) ou avec 1 g/L d'extrait polyphénolique T3 (c et d). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont subi la réaction de Thiery et été observées au MET en mode haut contraste.

Dans le cas de la recherche de polysaccharides chez les souches 14 196 et 14 213 ensemencées dans un vin rouge, on remarque dans la Figure 51 que la souche 14 196 a une structure différente de celle observée dans le vin blanc. En effet, il n'y a aucun complexe organisé en CPS et ceux-ci sont très groupés et peu diffus. Le taux de survie entre les deux matrices testées n'est cependant pas le même et peut ainsi être la cause ou la conséquence de cette absence d'EPS.

L'ajout de l'extrait T3 ne montre aucun amas sphérique dense aux électrons fixés à la paroi. Les cellules ont une surface du peptidoglycane homogène.

La souche 14 213, elle, après 7 jours dans le vin rouge présente clairement une forte production de polysaccharides (Figure 52). On observe une zone aux complexes très dense : la membrane, puis une zone compacte et très organisée (la paroi) et au-delà une zone aux complexes à la taille variable et très diffuse dans le milieu extracellulaire. Les projections peuvent relier une bactérie à une autre comme dans la Figure 52 a). L'extrait T3 ne semble dans certains cas pas modifier les structures des cellules de la souche ou dans d'autres cas diminuer la proportion de CPS ou d'EPS.

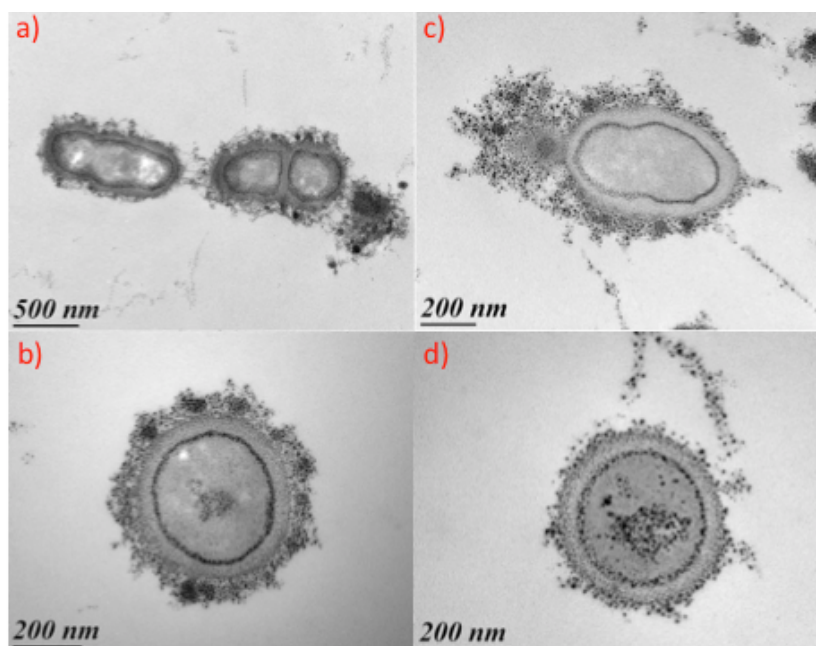


Figure 52 : Recherche de polysaccharides chez la souche 14 213 (VB) dans un vin rouge et en présence d'extraits polyphénoliques.

La souche 14 213 a été ensemencée dans du rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH3,6) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b) ou avec 1 g/L d'extrait polyphénolique T3 (c et d). Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont subi la réaction de Thiery et été observées au MET en mode haut contraste.

V.4. Mesure de la variation de l'épaisseur de la paroi

En plus de la présence d'une capsule plus ou moins importante selon les souches et les conditions de test, les observations au MET suggèrent que l'épaisseur de la paroi des cellules est également variable. Si cette observation est vraie, elle pourrait être importante, car la paroi joue un rôle non seulement dans la forme et la rigidité de la cellule, mais également dans la protection contre les variations de pression osmotique et les autres stress environnementaux.

Pour déterminer si les polyphénols ont un impact sur la paroi, des mesures précises de son épaisseur ont été réalisées d'après les clichés de MET obtenus lors des essais décrits précédemment. Les mesures ont été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ grâce à l'utilisation d'un programme type macro développé pour cette étude. Une modélisation en cercle via les aires (totale et du cytoplasme) mesurées sur les clichés de MET au même grossissement, a permis d'obtenir l'épaisseur de la paroi (Δr) et d'évaluer ainsi l'influence de la matrice et des extraits polyphénoliques (Figure 53).

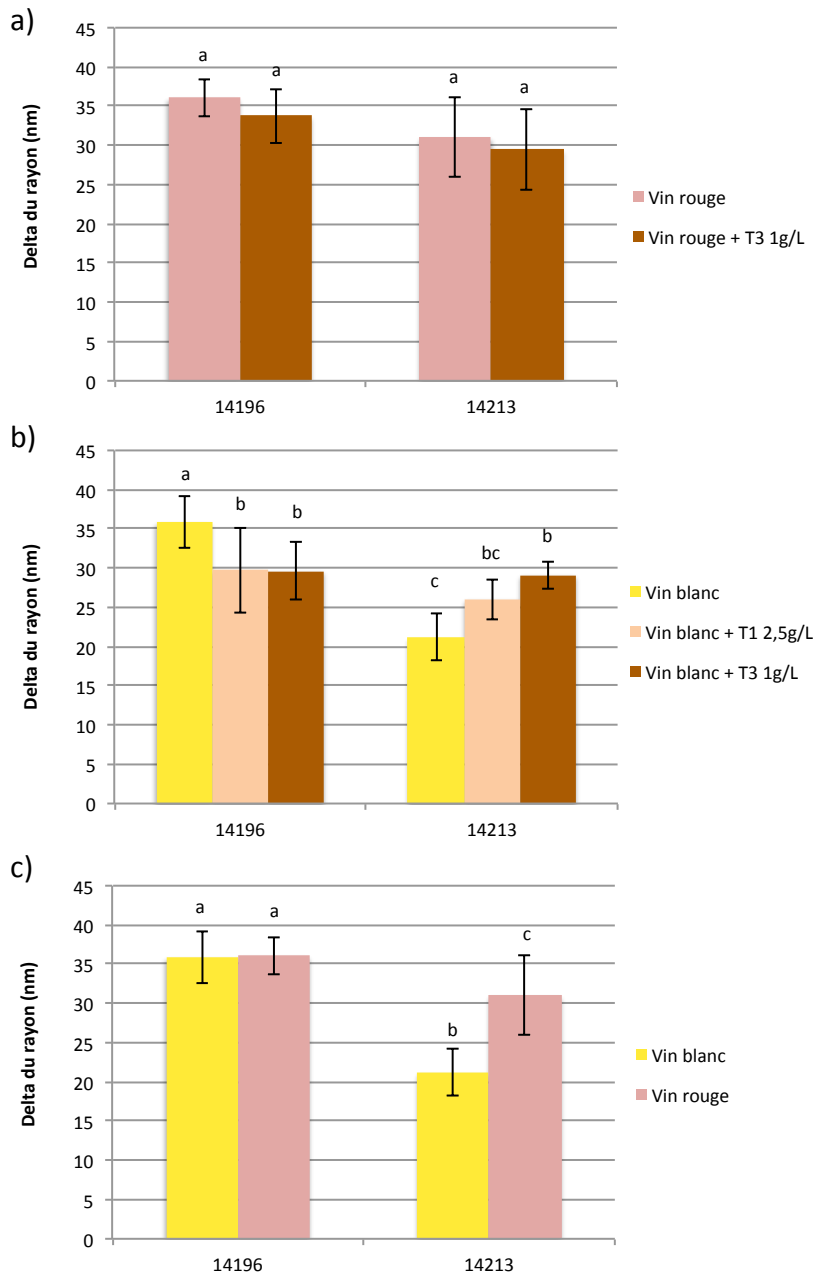


Figure 53 : Mesure de la taille de la paroi modélisée dans différentes conditions de stress polyphénolique.

Le delta du rayon calculé grâce à un programme type macro sur le logiciel ImageJ correspond à une valeur moyenne modélisée de l'épaisseur de la paroi des bactéries à partir des aires du cytoplasme et de la bactérie. Les photographies réalisées au MET au grossissement 200 000X des deux souches 14 196 appartenant au groupe VB et la souche 14 213 appartenant au groupe VR en présence de différents extraits polyphénoliques T1 à 2,5 g/L et T3 à 1 g/L dans deux vins différents (a) vin rouge (N° 3) et (b) vin blanc (N° 1) ont été utilisées pour réaliser les mesures. Le graphique (c) présente les résultats dans les vins témoins sans ajout de polyphénols pour les deux souches. Les histogrammes représentent la valeur moyenne de 10 mesures chacune effectuée sur une cellule différente, ainsi que les écarts types associés. La significativité des données a été testée par un test de Kruskal Wallis avec un α de 0,05 sous le logiciel R.

Dans le vin rouge, aucune différence significative de l'épaisseur de la paroi n'a été observée entre les souches 14 196 (groupe VB) et 14213 (groupe VR), et il n'y a pas eu non plus de variation avec l'ajout de polyphénols de l'extrait T3. Néanmoins dans le vin blanc, la paroi de la souche 14 196 est significativement plus épaisse que celle de la souche 14 213, respectivement 36 et 21 nm. En présence des extraits polyphénoliques T1 et T3, l'épaisseur de la paroi de la souche 14196 diminue sensiblement et, à l'inverse, celle de la souche 14 213 augmente, notamment en présence de l'extrait T3 à 1 g/L.

Lorsqu'on compare l'épaisseur de la paroi pour les deux souches dans les deux vins sans ajout supplémentaire de polyphénols, on remarque que les cellules de la souche 14213 ont une épaisseur de paroi significativement plus importante lorsqu'elles sont dans le vin rouge plutôt que dans le vin blanc.

Ces résultats sont cependant à nuancer du fait de l'éventuel biais apporté par la présélection des cellules par le choix du grossissement de 200 000 X. En effet les cellules photographiées dans un autre plan, en paire ou en fin de division ont été exclues des mesures.

VI. Comparaison des répertoires de gènes de production de polysaccharides des deux groupes de souches

Les différences morphologiques observées entre les souches 14 196 et 14 213, notamment la présence probable d'une capsule de polysaccharides et d'EPS chez la souche 14 213, suggèrent que les deux types de cellules ont des capacités de production d'EPS différentes. Les génomes de plusieurs souches de chaque groupe étant disponibles, les gènes potentiellement impliqués dans la production d'EPS ont été recherchés en utilisant comme références l'ensemble des gènes isolés ou en opérons décrits dans (Dimopoulou et al., 2014).

La Figure 54 présente les gènes identifiés chez les souches des deux groupes VB et VR. Elles possèdent des panels de gènes qui sont clairement différents selon le groupe auquel elles appartiennent, alors qu'au sein d'un même groupe, toutes les souches ont quasiment les mêmes gènes, à quelques exceptions près. Les principales différences entre les deux groupes de souches sont : 1) celles du groupe VB ont un opéron EPS1 de type C, alors qu'il est du type B chez l'autre groupe (voir ci-dessous) ; 2) l'opéron EPS2 est présent, mais tronqué chez toutes les souches du groupe VB, alors qu'il est totalement absent chez la plupart des souches du groupe VR sauf deux, 14 213 et 14 214, qui possèdent chacune un EPS2, bien qu'il s'agisse de deux modèles différents, et 3) toutes les souches du groupe VB possèdent le gène *gtf*, qui est responsable de la production du dextrane caractéristique des vins « filants » (Dimopoulou et al., 2014), alors que ce gène n'est présent chez aucune souche de l'autre groupe.

En dehors de ces différences, toutes les souches des deux groupes possèdent les gènes *dsrO* et *it3*, codant respectivement pour une dextransucrase et une priming glycosyltransférase. De plus, le gène *it4*, qui code pour une autre priming glycosyltransférase est présent chez une souche du groupe VB et 3 du groupe VR.

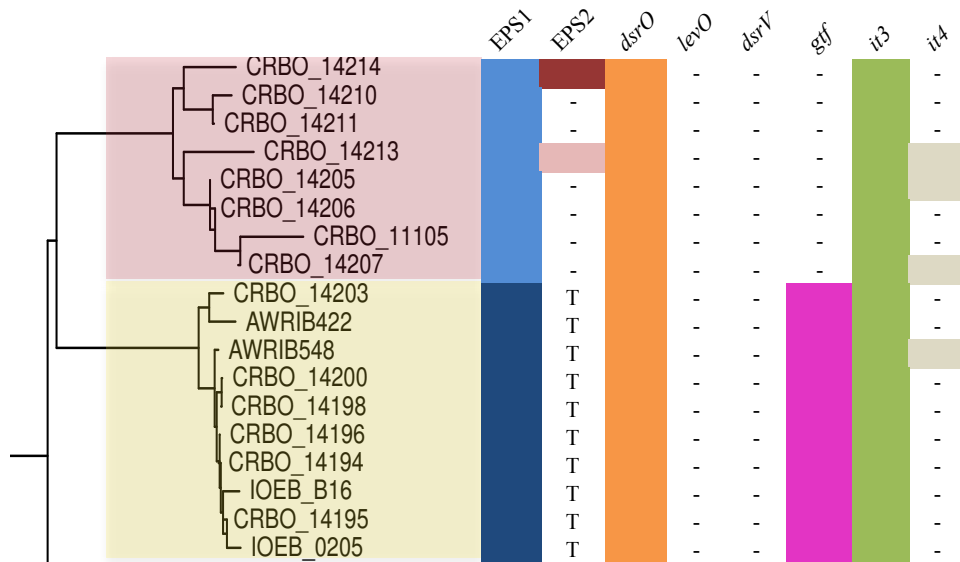


Figure 54 : Distribution des gènes de synthèse d'EPS chez les deux groupes phylogénétiques VB et VR.

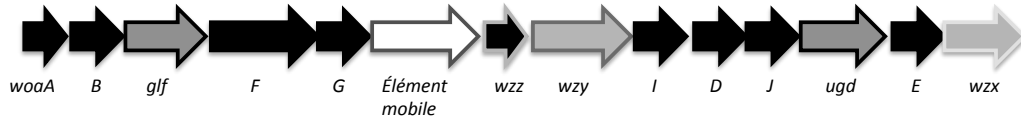
Les souches des deux groupes VR et VB sont représentées sur fond rouge ou jaune, respectivement, et arrangées selon leur distribution phylogénétique (Campbell-Sills, 2015). Les gènes de production d'EPS organisés en opérons (EPS1 et EPS2) ou isolés (*dsrO*, *levO*, *dsrV*, *gtF*, *it3*, et *it4*) sont nommés comme indiqué dans (Dimopoulou et al., 2014). EPS1 modèle : B : bleu clair, C : bleu foncé ; EPS2 : une couleur par modèle d'opéron ; l'absence d'opéron est indiquée par le signe (-) et la présence d'un opéron tronqué par la lettre T. La présence des gènes *dsrO*, *levO*, *dsrV*, *gtF*, *it3*, et *it4* est indiquée par les couleurs respectives suivantes : orange, violet, rose, vert et beige ; L'absence de gène est indiquée par le signe (-) et la présence d'un gène tronqué par la lettre T.

La Figure 55 présente l'organisation des opérons EPS1 et EPS2 identifiés dans les génomes des deux groupes de souches. Les opérons EPS1 des souches des groupes VB et VR sont proche, respectivement, des opérons de types C et B décrits précédemment (Dimopoulou et al., 2014).

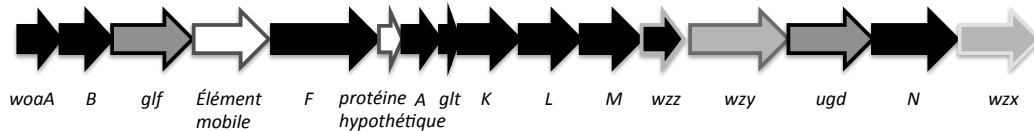
Il est cependant à noter que le type C décrit par Dimopoulou et al. (2014) est légèrement différent de celui identifié chez les souches VB qui contiennent des gènes supplémentaires codants pour une protéine d'élément mobile, une protéine hypothétique et une seconde priming glycosyltransférase WoaA. Toutes les souches du groupe VB possèdent un opéron EPS2 qui est tronqué après le gène *wze*, donc non fonctionnel. Cet opéron est absent chez toutes les souches du groupe VR, à l'exception des souches 14 213 et 14 214 qui ont deux opérons EPS2 différents, mais avec une partie néanmoins conservée comprenant les gènes *wzd* et *wze* impliqués dans la régulation, *wobA* codant pour une priming glycosyltransférase, suivi d'une glycosyltransférase

(*wodW* pour 14 214 et non identifiée chez 14 213). Le modèle d'EPS2 de la souche 14 214 ressemble à celui identifié chez la souche C52 par (Dimopoulou et al., 2014).

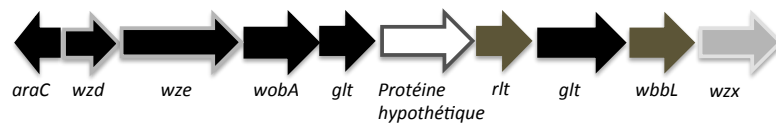
EPS1 souches VR



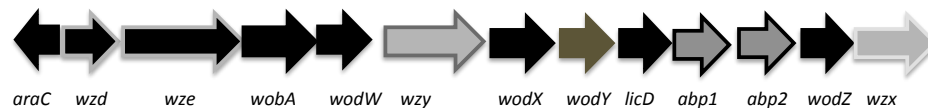
EPS1 souches VB



EPS2 souches 14213



EPS2 souches 14214



EPS2 souches VB

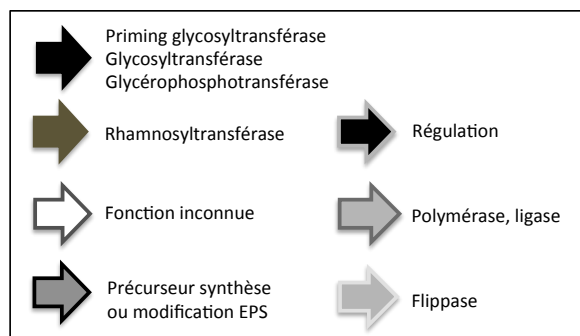
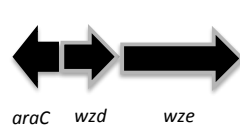


Figure 55 : Comparaison des opérons EPS1 et EPS2 des souches des groupes VB et VR.

Les organisations des opérons EPS1 et EPS2 identifiés dans les souches des groupes VB et VR ont été déterminées par comparaison avec les séquences des opérons EPS décrits par (Dimopoulou et al., 2014). Chaque flèche représente un gène codant pour une protéine dont la fonction est précisée dans la légende.

Celui-ci est composé de plusieurs gènes codant pour des glycosyltransférases (*wodW*, *wodX*, *wodZ*), une polymérase (*wzy*), une rhamnosyltransférase (*wodX*), une choline phosphotransférase (*licD*), une nucléotidyltransférase (*abp1*), une dTDP-glucose 4,6-dehydratase (*abp2*) et une flippase (*wxz*). Chez la souche 14213, l'opéron EPS2 est composé deux glycosyltransférases en plus de WobA, deux rhamnosyltransférases, une protéine hypothétique et une flippase *wxz* différente de celles précédemment identifiées.

VII. Discussion

L'existence de la sélection bactérienne durant le processus de vinification est à l'heure actuelle bien connue. Ainsi, une première sélection bactérienne intervient juste après la vendange, quand l'ensemble de population bactérienne est transféré de la surface de la baie de raisin au moût. De nombreuses espèces ne survivent pas au manque d'oxygène, au pH faible ou aux autres stress du vin (Lafon-Lafourcade et al., 1983) (Piao et al., 2015). Une seconde sélection entre en jeu par l'action des levures et de leur métabolisme lors de la FA, notamment avec l'augmentation de la concentration en éthanol. Le plus souvent, *O. oeni* devient la bactérie lactique la plus adaptée à la fin de cette fermentation. Cependant, des souches d'*O. oeni* peuvent se succéder durant les différentes phases de la vinification en fonction de leur croissance ou de leur capacité de résistance aux stress (Reguant et al., 2005). Les souches VB et VR majoritairement isolées de vins de Bourgogne sont particulièrement intéressantes de par leur appartenance à des groupes génétiques différents bien que très proche, mais également de par leur spécificité à des vins aux caractéristiques différentes (Khoury et al., 2016) (Campbell-Sills, 2015). Cela suggère ainsi la présence de l'ensemble de ces souches dans les vignes ou dans les chais de cette région et que la sélection bactérienne intervient alors durant la vinification de ces vins.

Le but de ce travail était donc d'établir un lien entre ces deux groupes de souches VB et VR dont l'adaptation au cours de l'évolution s'est effectuée dans des produits fondamentalement différents avec des caractéristiques phénotypiques précises.

Lors de ce travail, nous avons ainsi pu observer que les souches des groupes VB et VR ont des résistances différentes en fonction du produit dans lesquels elles ont été inoculées. En effet, les souches VB s'adaptent très bien à la matrice moût même en présence d'une forte acidité. Celles-ci se développent dans le moût jusqu'à un pH 2,8 tandis que les souches du groupe VR sont en survie à un pH de « 3 ». Cette tolérance aux pHs faibles est un avantage certain pour les souches du groupe VB pour la réalisation de la FML dans les vins blancs. De manière intéressante, certaines souches isolées de vins de Champagne ayant également des pHs très faibles généralement proche ou en dessous de 3, ont été caractérisées au niveau génomique et appartiennent toutes au groupe génétique VB (Bridier et al., 2010) (Campbell-Sills, 2015) (Sternes & Borneman, 2016). Néanmoins, on remarque que lors d'une inoculation directe dans le vin blanc, les souches VB ne parviennent pas à mieux s'adapter que les souches VR, même en présence d'une acidité importante.

On peut donc penser que lors de la vinification sur raisin blanc en Bourgogne ou en Champagne, il se passe une adaptation précoce des souches de VB dans le moût. La synergie d'une forte acidité avec l'augmentation progressive d'éthanol et l'absence de polyphénols permettent aux

souches du groupe VB d'être au moment de la fin de la FA en meilleure capacité de réaliser la FML par rapport aux souches du groupe VR.

De la même manière, les souches VR ont montré une très forte adaptation et une meilleure résistance à l'ajout d'extrait polyphénolique dans le vin rouge, mais seulement dans cette matrice et contrairement aux souches du groupe VB. Au niveau des extraits polyphénoliques testés, on remarque que l'extrait T3 composé principalement de tannins condensés induit une forte mortalité cellulaire dès la plus faible concentration. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux montrant les effets de ce type de tannins sur la viabilité cellulaire d'*O. oeni* (Figueiredo et al., 2008). De plus, les deux extraits T1 et T2, composés respectivement d'un mélange d'anthocyanes et de tannins condensés ou de catéchine et d'épicatéchine sous forme de monomère et de dimère montrent seulement un ralentissement de la croissance à forte concentration. Ces types de composés ont auparavant présenté peu d'effet ou des effets stimulants (Reguant et al., 2000) (Alberto et al., 2001) (Figueiredo et al., 2008) (Garcia-Ruiz et al., 2009). Ainsi, dans le vin rouge, les souches du groupe VR semblent être plus à même de résister à l'augmentation croissante d'extrait polyphénolique majoritairement composé d'oligomère sans doute de par la présence de molécules spécifique de ce type de vin comme les anthocyanes pouvant ainsi avoir un rôle dans leur métabolisme. En effet, de nombreux auteurs ont observé un effet stimulant des anthocyanes (Vivas et al., 1997). Ils ont en effet pu observer une stimulation de la FML réalisée par *O. oeni* associée à une dégradation des anthocyanes. On peut se demander si les souches VR ne présenteraient pas soit une plus forte capacité d'activation des gènes codant pour des β -glucosidases, soit une diversité plus importante vis-à-vis de ces enzymes. Les β -glucosidases sont capables de couper la liaison osidique des anthocyanes permettant ainsi la libération d'une molécule de glucose utilisable par *O. oeni* pour son métabolisme. Il existe une grande variabilité d'activité entre les souches d'*O. oeni* concernant les β -glucosidases (Grimaldi et al., 2005) et l'ajout d'enzyme commerciale avec une activité β -glucosidase a été corrélé avec une diminution de la quantité d'anthocyanes (Wightman et al., 1997). Néanmoins, ces différences phénotypiques entre les deux groupes génétiques auraient du être corrélées avec une étude approfondie des capacités fermentaires des souches comme celle précédemment initiée par (Khoury, 2014), mais prenant en compte l'adaptation précoce des souches de VB dans le moût même lors de très forte acidité.

Lors de l'étude morphologique des souches par microscopie électronique nous avons pu mettre en évidence de forts contrastes entre les deux groupes. Dans le vin blanc, la souche VB 14196 présente une capsule polysaccharidique qui disparaît ou se désorganise sous forme de complexe sphérique à la surface de la paroi lors de l'ajout de polyphénol. L'ensemble des souches VB ont une organisation de leur opérons polysaccharidiques similaire avec l'opéron EPS1 dérivé du

type C identifié par (Dimopoulou et al., 2014) et un opéron EPS2 tronqué, mais avec la présence du gène *gtf* codant pour une glucane synthase participant à la production de β -glucanes. Ce gène est rarement retrouvé chez *O. oeni*. Les souches VB pourraient donc être capable de produire des β -glucanes sans pour autant rendre le vin filant, car aucun phénotype de ce genre n'a été observé durant les nombreux essais. De plus, certains auteurs ont montré qu'une augmentation de la production de β -glucanes extracellulaires libres ou associés à la cellule était corrélé à une augmentation de la résistance lors de stress acide ou de fortes températures chez une souche de *Lactobacillus paracasei* recombinante présentant le gène *gtf* similaire à celui identifié chez *P. parvulus* (Stack et al., 2010). Dols-Lafargue et ses collègues ont par ailleurs montré que des souches d'*O. oeni* présentant le gène *gtf* fonctionnel étaient plus résistantes à l'éthanol, au pH et au SO₂ (Dols-Lafargue et al., 2008), voir au lysozyme chez *P. parvulus* (Coulon et al., 2012).

La souche VR 14213, elle, présente une CPS importante dans le vin blanc, voire des EPS dans le vin rouge ou lors d'ajout d'extrait polyphénolique. Lorsqu'on regarde l'organisation des opérons polysaccharidiques de ces souches on remarque que la souche 14213 possède un EPS1 de type B, mais une organisation particulière de son EPS2. La souche est en effet la seule avec 14 214 à avoir un EPS2. Cette particularité inconnue lors du début de cette étude peut donc être un biais pour la généralisation des corrélations entre le phénotype observé pour 14 213 et le génotype des souches du groupe VR. De plus amples observations et caractérisations devront donc être effectuées sur d'autres souches du groupe VR présentant un génotype différent afin de mieux comprendre l'implication des deux opérons dans la production d'EPS. Néanmoins, certains auteurs ont mis en lumière la difficulté d'établir des corrélations en ce qui concerne les EPS, car aucun génotype identifié à l'heure actuelle n'a été exclusivement associé à un phénotype (Dimopoulou et al., 2014). Il existe en effet de multiples associations génotype/phénotype ainsi que de fortes variabilités de conditions intégrant le milieu, les conditions de cultures et la présence de stress. De manière plus générale, la production d'EPS est coûteuse en énergie pour le métabolisme cellulaire et peut être induite par la présence de stress environnementaux. L'éthanol par exemple stimule la production d'EPS (Ciezack et al., 2010), tandis que l'acidité stimule la sur-expression du gène *dsrO* dans du jus de raisin sur une souche d'*O. oeni* (Dimopoulou, 2013). Dans un vin à pH 3,5 et 12 % d'éthanol, une souche d'*O. oeni* sous forme de biofilm surexprime de nombreux gènes impliqués dans la production d'EPS (*wobB*, *dsrO*, *levO*, *wobO*) en comparaison avec un biofilm non stressé (Bastard et al., 2016). La présence combinée de différent stress dans nos expérimentations pourrait donc expliquer la présence importante de capsule et d'EPS et permettre l'adaptation des souches dans les différents vins.

En plus des différences d'opérons polysaccharidiques, les souches des groupes VB et VR présentent des variations au niveau de diverses régions génomiques. Des travaux internes au laboratoire ont montré la présence uniquement chez les souches VR de PTS du mannitol (IIA, IIB

et IIC) ainsi que la mannitol 1-phosphate 5 dehydrogénase (Trevisan, 2017). D'un autre côté, les souches VB possèdent une PTS spécifique au fructose (*fruD*) permettant la production du fructose-1-phosphate pouvant ainsi rentrer dans la voie homofermentaire Embden Meyerhof et obtenir de l'énergie supplémentaire sous forme d'ATP grâce aux enzymes 1-phosphofructokinase et fructose 1,6 biphosphate aldolase (Cibrario et al., 2016).

La complète compréhension des différences d'adaptation entre les deux groupes de souches pour le vin rouge ou le vin blanc nécessite cependant de plus amples expérimentations.

Une étude globale intégrant transcriptomique, protéomique et métabolomique serait donc à envisager sur ces aspects afin de relier des caractéristiques génomiques intéressantes avec les phénotypes observés lors de ces travaux. Ainsi, on pourrait déterminer si ces différences d'organisation d'opérons polysaccharidiques, de métabolisme glucidique sont retranscrites lors de l'adaptation dans différentes matrices ou bien encore si les mécanismes de réponses aux stress sont activés de manière séquentielle lors de la vinification (du moût au vin) en fonction du groupe de souche.

Chapitre 2 : Étude de la tolérance à l'acidité de souches d'*O. oeni* industrielles

I. Objectifs et choix des souches testées

Les souches d'*O. oeni* ont des tolérances variables à l'acidité du vin comme nous avons pu le constaté dans le chapitre I pour les deux groupes de souches adaptées aux vins blancs et rouges rencontrés en Bourgogne. Les mécanismes moléculaires et physiologiques mis en œuvre par les bactéries pour résister à l'acidité du vin ont également été recherchés lors de nombreux travaux (Guzzo et al., 1994) (Tourdot-Maréchal et al., 2000) (Beltramo et al., 2006) (Bourdineaud, 2006) (Olguín et al., 2009). Néanmoins, ces mécanismes ne sont pas complètement connus. En effet, aujourd'hui encore, même en disposant des séquences des génomes des souches, il est impossible de prédire quel sera leur comportement dans un vin de pH plus ou moins bas. Pour tenter de mieux comprendre cette adaptation à l'acidité, nous avons souhaité utiliser une stratégie basée sur la protéomique quantitative, qui peut aider à obtenir une vision globale des modifications cellulaires survenant lors du stress acide et qui a été peu employée chez *O. oeni* jusqu'ici (Margalef-Català et al., 2016a).

Plutôt que de travailler sur les souches des groupes de vins blancs et rouges du chapitre I, nous nous sommes intéressés aux souches commerciales, car elles sont sélectionnées pour leurs meilleures aptitudes à survivre dans le vin et à réaliser les FML. Par conséquent, au moins certaines de ces souches doivent être particulièrement tolérantes à l'acidité. Le Tableau 10 présente l'ensemble des souches commercialisées ou en développement mises à notre disposition par la société Lallemand. Leurs limites de tolérance aux principaux stress du vin ont été déterminées par l'industriel au cours de la sélection des souches et sont également indiquées. Globalement, ces 11 souches semblent avoir des tolérances qui sont assez proches. Elles peuvent réaliser la FML jusqu'à 14 à 16 % d'éthanol, à des températures minimales de 13 à 18 °C, en présence d'un maximum de 45 à 60 mg/L de SO₂ et jusqu'à des pH de l'ordre de 3,1-3,2 en moyenne, bien qu'une souche semble tolérer un pH plus bas (2,9) et une autre au contraire un pH plus élevé (3,4). Nous avons également eu des informations concernant les produits dont elles ont été isolées : origine géographique (Italie, Bourgogne, Bordelais, Languedoc) et type de vin (rouge, blanc, champagne). De plus, les génomes de toutes ces souches étaient à notre disposition.

Tableau 10 : Caractéristiques des souches commerciales utilisées.

Souches	Origine	Tolérance éthanol	Tolérance pH	Tolérance température	Tolérance SO ₂
LAL01	Rouge Languedoc	14.5 %	3.4	18 °C	50 mg/L
LAB6	Rouge Italie	16 %	3.1	16 °C	60 mg/L
LAC20	Blanc (Aligoté) Bourgogne	14 %	3.1	13 °C	45 mg/L
LAA1	Blanc (Sauvignon) Bordeaux	15 %	3.2	14 °C	50 mg/L
LAD1	Blanc (Chardonnay) Bourgogne	14.5 %	3.1	13 °C	45 mg/L
LAA4	Rouge Italie	16 %	3.1	16 °C	60 mg/L
LAB9	Rouge Italie	15 %	3.2	14 °C	60 mg/L
LAB2013	Rosé (Syrah/Grenache) Provence	16 %	3.1	14 °C	60 mg/L
LAL02	Blanc Languedoc	15.5 %	3.2	16 °C	50 mg/L
LAD2	Rouge (Pinot noir) Bourgogne	14.5 %	3.3	14 °C	50 mg/L
LACHT18	Blanc Champagne	14 %	2.9	15 °C	50 mg/L

Lors de leur production industrielle, les souches sont toutes lyophilisées selon le procédé MBR®, qui permet une inoculation directe dans le vin, à l'exception de la souche LACHT18, qui nécessite une étape de préacclimatation avant inoculation dans le vin en conditions réelles d'utilisation, mais qui a été préparée comme les autres souches lors des tests réalisés pour cette étude. Dans la mesure où ce procédé de production a un effet sur l'état physiologique des cellules, et en particulier sur leur tolérance à l'acidité, nous avons analysé les cellules lyophilisées et les mêmes souches cultivées en milieu de laboratoire et stockées congelées à -80 °C. Ces dernières sont désignées « version liquide ». Une première partie des travaux a consisté à comparer la tolérance à l'acidité des souches lyophilisées et « version liquide ». Puis nous avons sélectionné une souche et nous avons analysé son protéome après exposition dans un vin ajusté à différentes valeurs de pH.

II. Évaluation de la tolérance à l'acidité de cinq souches commerciales

Pour choisir la souche et les conditions de tests les plus appropriées lors de l'analyse de protéomique, nous avons tout d'abord comparé les comportements de plusieurs souches commerciales après inoculation dans des vins. Les souches choisies pour réaliser cette étude sont deux souches isolées de vin rouge (LAB6 et LAL01), deux de vin blanc (LAD1 et LAA1), et une de vin rosé (LAB2013). La survie des souches lyophilisées ou cultivées en milieu liquide a été testée dans un vin blanc et un vin rouge, de cépages Chardonnay et Gamay, ajustés à différentes valeurs de pH : 2,8 ; 3,0 ; 3,3 ; 3,6 et 4,0. Les souches ont été inoculées à $2,0 \times 10^6$ cellules/ml et leurs populations ont été mesurées après 2, 7 et 14 jours.

II.1. Essais réalisés dans un vin blanc

La Figure 56 présente les résultats obtenus dans le vin blanc. 48 h après inoculation, les populations de toutes les souches sont inférieures à la population inoculée, sauf celle de la souche LAL01 en version liquide, qui est plus importante à toutes les valeurs de pH de 2,8 à 3,6. Cette diminution globale des populations n'est pas surprenante, car de manière empirique, il est bien connu que l'inoculation dans le vin induit souvent la mortalité d'un certain pourcentage des cellules (communication personnelle Magali Bou Deleris). Cette mortalité est cependant relativement faible, puisque la diminution des populations est toujours inférieure à un facteur 10, sauf pour la souche LAD1 « liquide » qui a diminué de plus de 99 % à pH 2,8. Après 7 jours, l'effet du pH est nettement plus visible. En effet, de pH 3,3 à 4,0, presque toutes les souches ont conservé le même niveau de population ou se sont développées, alors que leur déclin s'est poursuivi à pH 3,0 et 2,8.

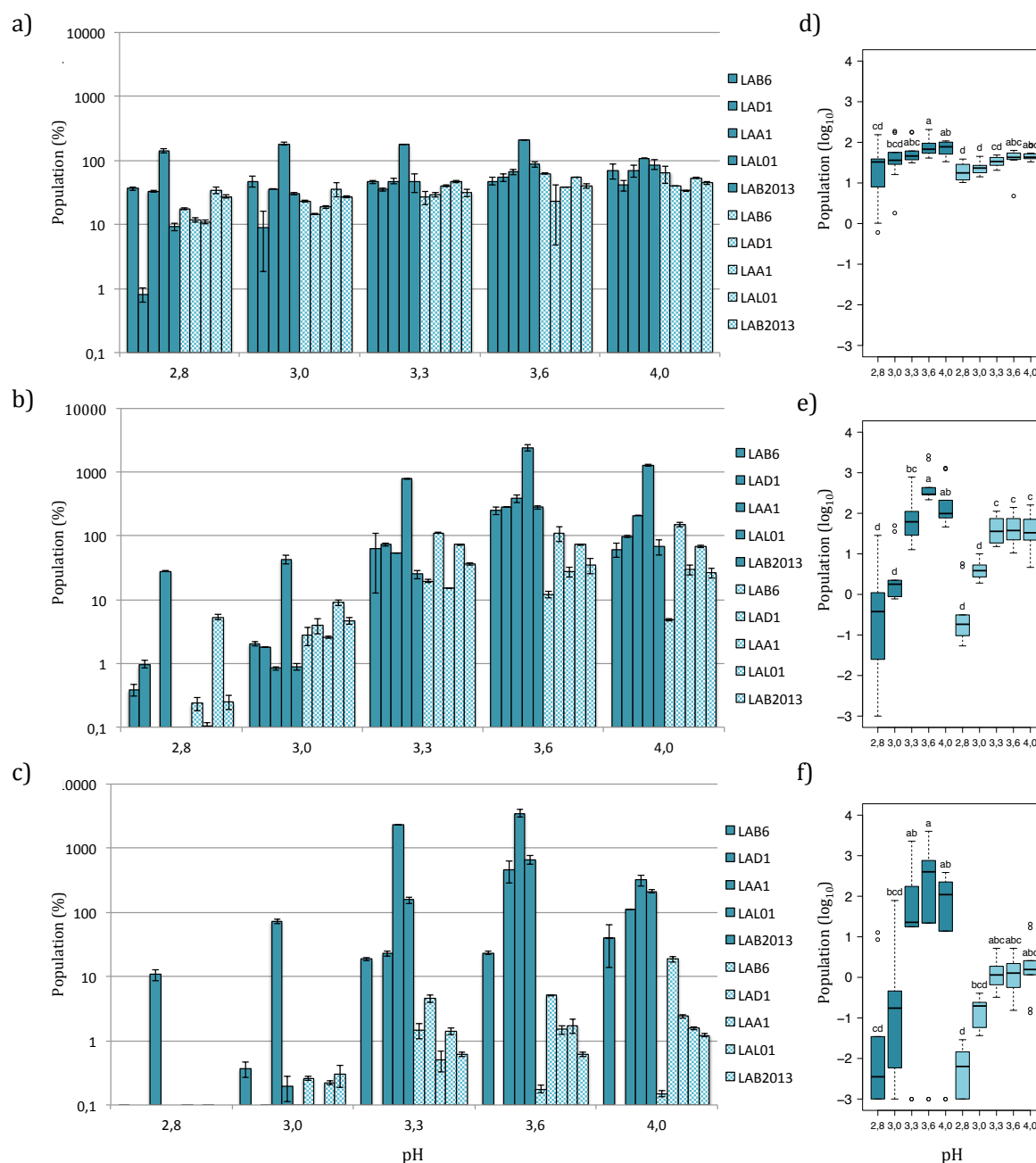


Figure 56 : Influence du pH sur la survie des souches commerciales en fonction du pH dans un vin blanc.

Les souches commerciales en version liquide (en **bleu foncé**) et lyophilisées (en **bleu clair**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin blanc (N° 2) ajusté à différent pH (2,8 ; 3,0 ; 3,3 ; 3,6 et 4). Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et à 14 jours (c). Une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés sous le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

Il semble que les souches « liquides » ont globalement mieux résisté aux valeurs de pH 3,3 à 4,0 que les autres ; elles ont atteint des niveaux de population équivalents ou supérieurs à ceux qui avaient été inoculés. En dessous de pH 3,3, il n'y a pas de différence significative entre les deux types de souches.

Enfin, 14 jours après inoculation, l'étude statistique ne montre aucune différence significative entre les deux groupes de souches. Néanmoins, ce résultat semble provenir de la forte mortalité de la souche LAD1 « liquide » dans toutes les conditions de pH testées. On remarque donc qu'il y a tout de même une résistance importante des souches « liquides » suivantes LAB6, LAA1 et LAL01 à pH 3,3. À pH 3,6 et 4, les souches « liquides » LAA1, LAL01 et LAB2013 ont un taux de survie supérieur à 100 % de la population inoculée. Les souches lyophilisées ont une survie visiblement plus faible que les souches liquides bien que l'analyse statistique indique que cette différence est non significative.

II.2. Essais réalisés dans un vin rouge

Les mêmes souches ont été inoculées dans un vin rouge de cépage Gamay dans des conditions de stress identiques. Les résultats de dénombrement après 48 h, 7 jours et 14 jours sont présentés dans la Figure 57.

48 h après inoculation, l'évolution des populations est quasiment la même que ce qui avait été observé dans le vin blanc, à savoir qu'il y a eu une mortalité de toutes les souches, conduisant à une diminution de leurs populations de moins d'un facteur 10. Dans ce vin, toutes les souches semblent avoir été affectées de la même manière, qu'elles aient été testées sous forme liquide ou lyophilisée, et il n'y a pas non plus une différence importante des populations en fonction du pH. À 7 jours, aux pH les plus élevés (3,3 à 4,0), les populations de la plupart des souches ont peu évolué, contrairement à ce qui était observé dans le vin blanc. Cela suggère que leur phase d'acclimatation est plus longue dans ce vin que dans l'autre, peut être en raison du stress supplémentaire causé par les polyphénols. De plus, leurs populations ont continué à chuter à pH 3,0 et de manière très significative à pH 2,8, ce qui est logique compte tenu du stress plus important de ces deux conditions.

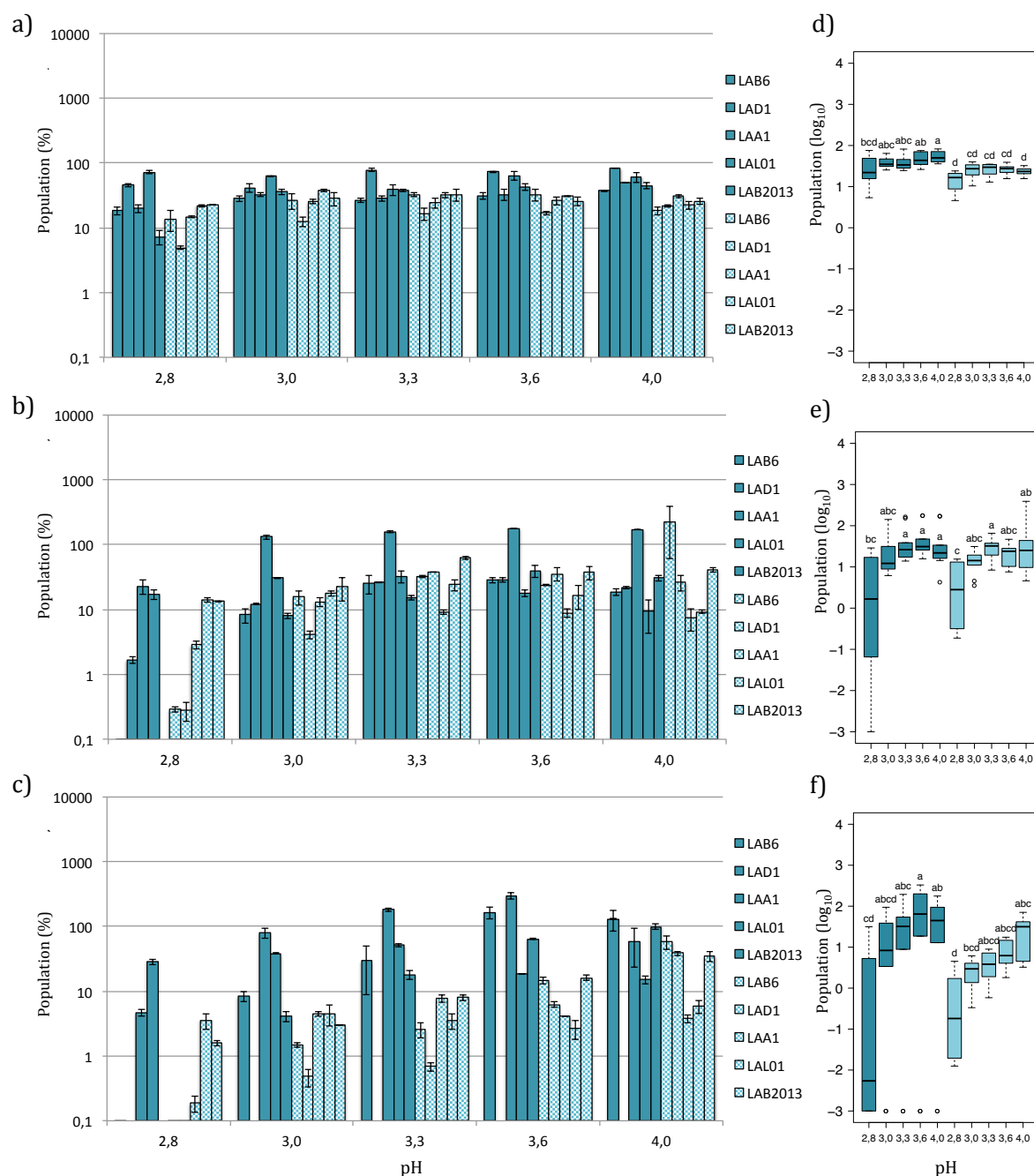


Figure 57 : Influence du pH sur la survie des souches commerciales dans un vin rouge.

Les souches commerciales en version liquide (en **bleu foncé**) et lyophilisées (en **bleu clair**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin rouge (N° 5) ajusté à différent pH (2,8 ; 3,0 ; 3,3 ; 3,6 et 4). Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé à 48 h (a), 7 jours (b) et à 14 jours (c). Une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été effectués en duplicata. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés sous le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

Néanmoins, certaines souches se démarquent des autres. La souche LAA1 « liquide » s'est développée dans toutes les conditions de pH 3,0 à 4,0, jusqu'à atteindre des niveaux de population supérieurs au niveau initial d'inoculation. C'est assez inattendu dans la mesure où il s'agit d'une souche isolée d'un vin blanc. La souche LAB6 lyophilisée s'est également bien développée à pH 4, mais uniquement à ce pH. Après 14 jours, les populations de la majorité des souches ont stagné ou décliné, parfois jusqu'à devenir non mesurables aux pH les plus bas. Néanmoins, la souche LAA1 est restée à des niveaux importants et d'autres souches ont commencé à se développer, comme LAB6 et LAL01 « liquides » à pH 3,6 et 4,0. Dans ce vin, il n'a pas été observé de différences significatives entre les conditions « liquides » et lyophilisées.

II.3. Capacités de transformation de l'acide malique en fonction du pH

Au bout des 14 jours de tests décrits ci-dessus, nous avons mesuré les teneurs résiduelles en acide malique, afin de mieux percevoir si les bactéries ont eu une activité métabolique importante ou non durant toute la période d'exposition au stress acide. La Figure 58 présente le pourcentage de dégradation de l'acide L-malique pour les différentes conditions testées dans les deux types de vins.

Une dégradation totale ou proche de 100 % n'a été atteinte que pour les essais réalisés à pH 3,6 ou 4 et seulement pour certaines souches. Aux pH plus faibles, la dégradation oscille entre 0 et 70 %. De plus, le type de vin ou les conditions d'utilisation (lyophilisée ou « liquide ») n'ont pas eu le même impact selon les souches. La souche LAB6 a été la plus performante dans le vin rouge, autant sous forme lyophilisée que liquide. Par contre, dans le vin blanc, seule la préparation liquide a dégradé la quasi-totalité de l'acide malique aux pH les plus élevés. La souche LAD1 a également dégradé une bonne partie de l'acide malique et elle a eu un comportement similaire dans les deux types de vins et quel que soit son mode de préparation. La souche LAA1 a été l'une des moins actives dans les deux vins, y compris aux pH les plus élevés. En moyenne, elle a dégradé seulement 30 à 40 % de l'acide malique dans toutes les conditions testées. La souche LAL01 a été l'une des plus efficaces dans le vin blanc et sous forme liquide. En effet, dans ces conditions, elle a dégradé la quasi-totalité de l'acide malique aux pH 3,6 et 4, mais également à pH 3,3 avec plus de 50 % de dégradation. Cependant, elle a été nettement moins active sous forme lyophilisée, quel que soit le pH. Et elle a également été peu efficace dans le vin rouge, quel que soit le pH ou la forme de préparation. Une situation encore différente a été observée avec la souche LAB2013. Elle était plus efficace sous forme lyophilisée dans le vin rouge et elle a également bien consommé l'acide malique à pH 3,6 et 4 sous forme liquide dans les deux types de vins, mais son activité a été très faible aux pHs inférieurs à 3,6. Il

n'y a donc pas eu un comportement unique de l'ensemble des souches, mais presque autant de comportements différents que de souches.

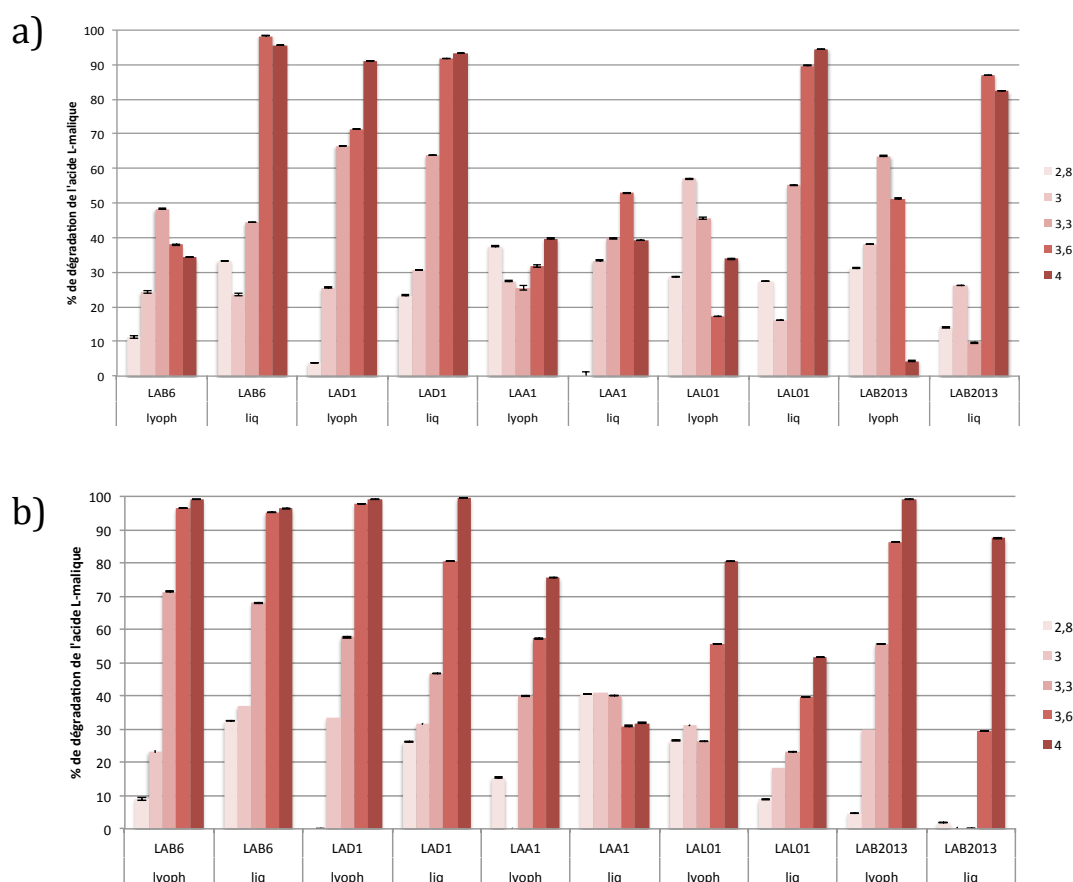


Figure 58 : Dégradation de l'acide L-malique par les souches commerciales en fonction du pH et du type de vin.

Les échantillons des tests phénotypiques sur l'influence de la lyophilisation sur la survie en fonction du pH ont été prélevés à 14 jours et l'acide L-malique a été dosé. Le pourcentage de dégradation de l'acide L-malique a été calculé dans le vin blanc (N° 2) : (a) et le vin rouge (N° 5) : (b) selon les souches commerciales utilisées en version liquide (liq) ou lyophilisées (lyoph) et selon le pH (2,8 ; 3 ; 3,3 ; 3,6 et 4). Les dosages ont été effectués en dupliqua et les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les répliques biologiques, ainsi que les écarts types.

Si l'on compare ces résultats avec les niveaux de populations mesurés précédemment, il est logique que la dégradation de l'acide ait été la plus importante à pH 3,6 et 4,0, car cela correspond aux conditions auxquelles les populations étaient également les plus importantes. Néanmoins, les niveaux de populations mesurés après 14 jours ne sont pas toujours corrélés avec les taux de dégradation de l'acide malique. Par exemple, dans le vin blanc, la souche LAD1 a bien dégradé l'acide malique sous forme lyophilisée ou liquide, mais pourtant, après 14 jours,

sous forme liquide, sa population était quasiment indétectable, et sous forme lyophilisée, elle était inférieure à 10 % de la population initiale.

Par conséquent, il est probable qu'elle a dégradé l'acide malique pendant les premiers jours de l'essai, alors qu'elle était en phase de déclin. Cette situation est également visible pour d'autres souches dans d'autres essais. Il était donc indispensable de réaliser ces dosages de l'acide malique, afin de compléter les dénombrements de populations bactériennes et de bien choisir la souche et les conditions de tests pour l'analyse des protéomes. De plus, ces résultats montrent bien la diversité de comportement des souches dans un environnement acide et en fonction, non seulement du type de vin, mais également des conditions de préparations, lyophilisée ou liquide. À ce jour, ce comportement reste imprédictible. Même l'origine d'isolement des souches (vin rouge, blanc ou rosé) n'est pas toujours corrélée avec un bon développement de la bactérie dans un autre vin du même type, comme il a été constaté ici.

III. Analyse protéomique de la résistance à l'acidité

III.1. Essai préliminaire réalisé dans milieu « jus de raisin »

Pour identifier les gènes et les voies métaboliques impliqués dans la tolérance d'*O. oeni* à l'acidité du vin, nous avons réalisé une analyse de protéomique quantitative de la souche commerciale LAL01, qui était la plus résistante à l'acidité dans les essais décrits précédemment. Néanmoins, un essai préliminaire avait été initié au laboratoire pour mettre en place ce type d'analyse (Étude protéomique ou EP n°1). Il avait été réalisé sur la souche 14 217 provenant de la collection CRB CENO, qui est issue de cidre (Khoury, 2014), car cette souche est particulièrement résistante à l'acidité (Trujillo, 2015). Elle avait été incubée dans un milieu « jus de raisin » ajusté à pH 2,8 ; 3,0 ; 3,3 ou 4,0 et après 7 jours d'incubation, les cellules avaient été récoltées par centrifugation, congelées et transmises à la Plate-forme Protéomique du Centre de Recherche du CHU de Québec. La suite de cet essai a été réalisée dans le cadre de cette thèse. Les protéines ont été extraites et quantifiées par la méthode iTRAQ en 4-plex. Cette méthode est basée sur un marquage isotopique des protéines extraites à partir de quatre échantillons biologiques différents. Les protéines sont réduites, alkylées et digérées par la trypsine ; après le marquage de chaque échantillon par un des quatre réactifs iTRAQ, les 4 échantillons sont mélangés à parts égales. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie et analysés en MS/MS.

Dans cet essai, la valeur de pH « 4 » correspond à la condition témoin « non stressante ». Les trois autres conditions, pH 2,8 ; 3,0 et 3,3, sont les conditions stressantes, mais que la souche 14 217 tolère bien (Trujillo, 2015). Un génome « draft » de cette souche a été produit au

laboratoire. L'assemblage obtenu comprend 1,836,772 pb réparties dans 108 contigs. Son annotation par RAST indique la présence de 1958 séquences codantes et 46 gènes d'ARNr et ARNt (Campbell-Sills, communication personnelle).

À partir de ces 4 échantillons, 1348 protéines uniques ont été analysées, ce qui représente 68,8 % de toutes les séquences codantes du génome de la bactérie. Cette proportion est très importante compte tenu du fait qu'un certain nombre des séquences codantes doivent correspondre à des pseudogènes et que toutes les protéines codées par un génome ne sont pas exprimées en permanence. Cela montre que le protocole utilisé a permis d'extraire et de quantifier la plus grande partie des protéines de la bactérie.

Les protéines identifiées ont été analysées en comparant les 3 conditions « stressantes » (pH 2,8 ; 3,0 ; 3,3) à la condition « non stressante » (pH 4,0). Le nombre total de protéines analysées pour chaque combinaison, ainsi que les nombres de protéines sur- ou sous-exprimées sont indiqués dans le Tableau 11. Pour ces dernières, il a été calculé le ratio des niveaux d'expression dans les deux conditions comparées, comme par exemple pH 2,8/pH 4,0. Les protéines avec un ratio inférieur à 0,8 sont sous-exprimées, elles sont sur-exprimées si le ratio est supérieur à 1,2, et sans changement d'expression s'il est compris entre 0,8 et 1,2.

Tableau 11 : Protéines identifiées chez la souche 14 217 par comparaison des conditions stressantes et non stressantes.

Conditions testées	pH 2,8/pH 4,0	pH 3,0/pH 4,0	pH 3,3/pH 4,0
Protéines uniques analysées	932	1054	1129
Protéines sur-exprimées	172 (19 %)	149 (14 %)	76 (7 %)
Protéines sous-exprimées	88 (9 %)	151 (14 %)	38 (3 %)

L'absence de répliquas biologiques ne nous a pas permis d'effectuer d'analyse statistique et de déterminer la significativité des résultats. Néanmoins, il était intéressant d'analyser plus précisément les protéines identifiées. La Figure 59 montre que 6 protéines ont été sous-exprimées et 14 sur-exprimée dans toutes les conditions stressantes. Les protéines sous-exprimées sont un régulateur de transcription, une NADH-flavin réductase, une tyrosine/serine phosphatase, une protéine de phage et deux protéines non caractérisées (Annexe 2). Sur les 14 protéines sur-exprimées, plusieurs pourraient être liées à des mécanismes de réponse au stress : une malate perméase, une « general stress protein », un symporteur arabinose/H⁺. Les autres sont un transporteur du type ABC, un régulateur de transcription MraZ, une pyruvate oxydase, une phosphoribosyl transférase, une histidine kinase, une aldo/céto réductase, une « acyl carrier protein », une arginosuccinate synthase et 3 protéines non caractérisées (Annexe 2).

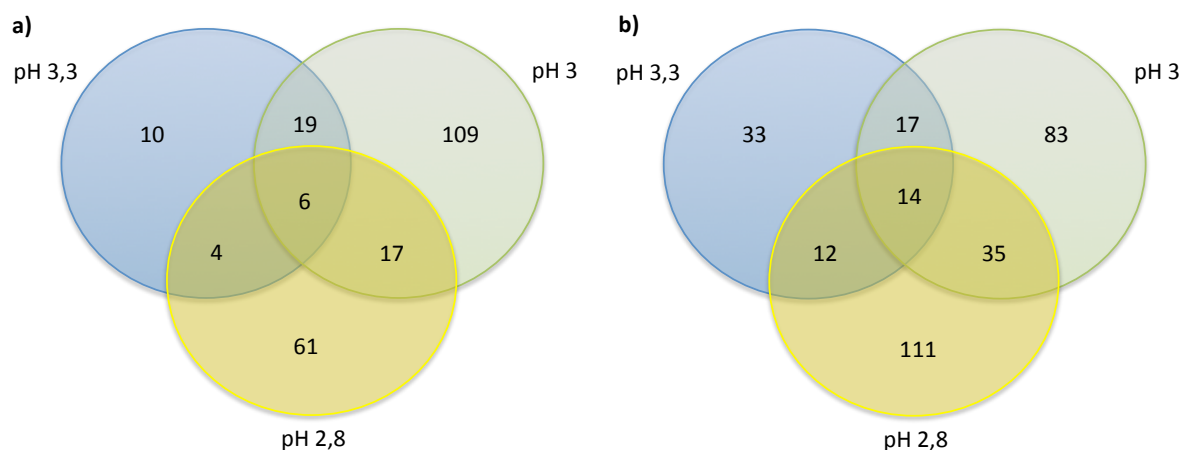


Figure 59 : Répartition des protéines identifiées lors de l'étude protéomique n° 1 iTRAQ dans un moût en fonction du pH.

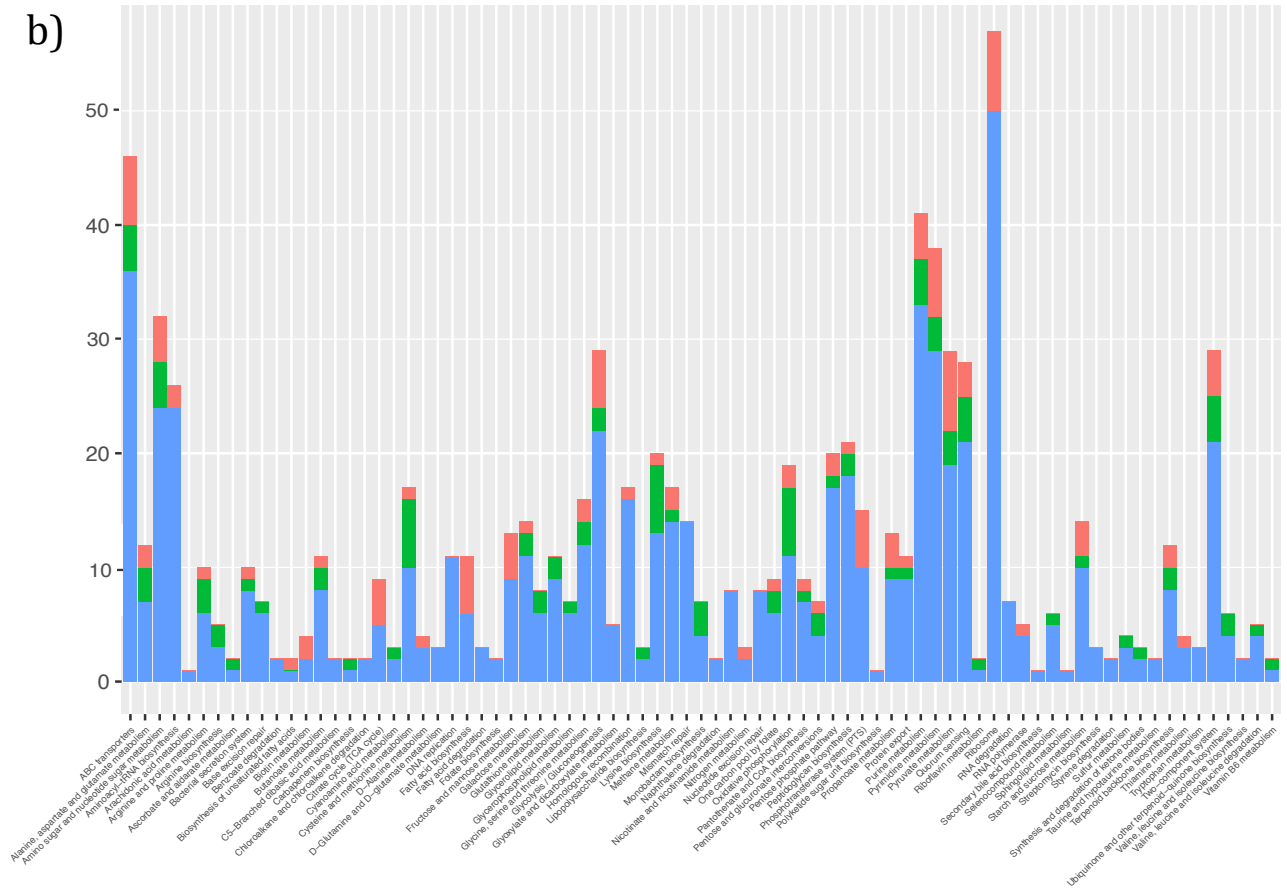
Le nombre de protéines identifiées et quantifiées aux différentes conditions de pH (2,8 ; 3 et 3,3) par analyse protéomique iTRAQ a été représenté sous forme de différents diagrammes de Venn pour les protéines sous-exprimées avec un ratio inférieur à 0,8 (a) et les protéines sur-exprimées avec un ratio supérieur à 1,2 (b).

La modalité à pH 2,8 est celle où il y a le plus de protéines sur-exprimées et identifiées uniquement dans cette condition (111 protéines). La modalité à pH 3 est celle ayant le plus de protéines sous-exprimées et uniquement retrouvées dans cette condition (109 protéines). Beaucoup de protéines semblent être retrouvées dans les deux modalités les plus acides (17 protéines sous-exprimées et 35 sur-exprimées). Parmi les protéines sur-exprimées, se trouvent des transporteurs de peptides et de sucres, diverses oxydases/réductases, une sous unité de l'ATPase et une glutathione réductase.

Pour obtenir une vision globale des voies métaboliques sur- ou sous-exprimées dans les différentes conditions testées, toutes les protéines identifiées ont été comparées aux enzymes des voies métaboliques de la base de données de KEGG. Pour l'espèce *O. oeni*, seules les protéines de la souche PSU-1 sont implémentées dans KEGG. Par conséquent, les protéines identifiées chez la souche 14217 ont été comparées à celles de la souche PSU-1 pour pouvoir les localiser dans les voies métaboliques de KEGG. La Figure 60 présente les nombres de protéines identifiées dans chaque voie métabolique lors des 3 comparaisons (pH 2,8 ; 3,0 ; 3,3 versus pH 4,0). Les nombres de protéines sans modification d'expression, sur- ou sous-exprimées sont précisés.

La Figure 60 montre que la quasi-totalité des voies métaboliques sont affectées par l'exposition aux deux conditions les plus stressantes (pH 2,8 et 3,0), alors que dans la comparaison pH 3,3/pH 4,0, il n'y a des changements d'expression que dans 31 des 79 voies analysées. Dans

b)



c)

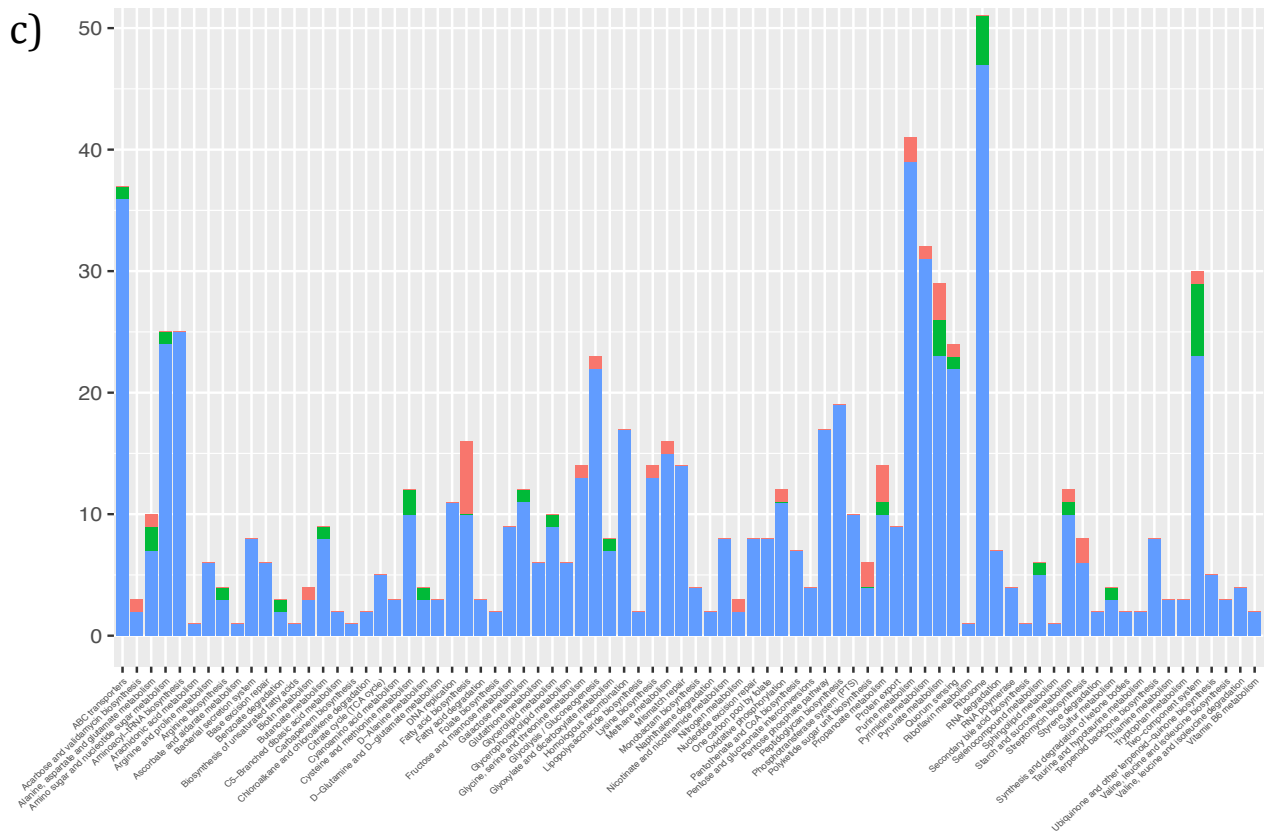


Figure 60 : Distribution des protéines identifiées dans les voies métaboliques de la base de données KEGG.

Les protéines de la souche 14217 identifiées par iTRAQ lors de l'exposition dans un moût à différents pH ont été localisées dans les voies métaboliques de la base de données KEGG en utilisant la souche PSU-1 comme référence. La figure présente les comparaisons entre pH 2,8 et 4 (a), pH 3 et 4 (b) et pH 3,3 et 4 (c). Les histogrammes représentent les nombres de protéines sur-exprimées (en vert), sous-exprimées (en rouge), et sans changement d'expression (en bleu).

Comme indiqué précédemment, cette analyse des voies métaboliques de KEGG n'est pas exhaustive, car elle ne détecte que les protéines qui sont également présentes chez la souche PSU-1. Nous avons analysé séparément les autres protéines, qui sont présentes chez la souche 14217 et absentes chez la souche PSU-1 (Annexe 1). Il y a ainsi :

- 43 protéines pour la modalité pH 2,8/pH 4, dont 3 sont sur-exprimées et 8 sous-exprimées
- 45 protéines pour la modalité pH 3/pH 4, dont 5 sur-exprimées, 7 sous-exprimées
- 50 protéines pour la modalité pH 3,3/pH 4, dont 3 sur-exprimées et 4 sous-exprimées

Les protéines identifiées et leurs niveaux d'expression sont cohérents avec les observations issues des voies métaboliques. Par exemple, une protéine du métabolisme de l'arginine, une arginosuccinate lyase, est sur-exprimée à pH 2,8 et 3,0, mais pas à pH 3,3. Néanmoins, il était intéressant de remarquer une protéine de phage (phage tail protein) qui était sous exprimée dans toutes les conditions. Ce qui suggère que le stress acide est défavorable à la production de particules phagiques.

On peut donc penser qu'il y a une activation de la réponse au stress en fonction du niveau de pH dans le moût. En effet, à pH 3,3 dans le moût blanc avec 6 % d'éthanol et la présence de sucres, le stress n'est pas assez important pour déclencher certains mécanismes de résistance. Il y a donc peu d'activation ou de répression au niveau des différentes voies métaboliques. Les protéines ont globalement un ratio d'expression proche de 1 lorsqu'on compare la modalité à pH 3,3 à pH 4. Néanmoins, on remarque une forte sur-expression de l'opéron citrate et du métabolisme du pyruvate. De manière plus isolée, on peut noter l'activation de l'enzyme malolactique. Il n'y a cependant pas de sur-expression des mécanismes connus de réponses au stress acide comme l'activation de l'ATP synthase.

Lorsqu'on baisse le pH à 3, on observe l'apparition de la mise en place de certains mécanismes de résistance au stress comme l'activation de l'ATP synthase. De plus, l'utilisation du citrate par l'activation de son opéron est également observée. Enfin, à ce pH il y a une activation de l'élimination de la glutathion disulfide (GSSH) par l'action de la GshR et grâce à la

décarboxylation oxydative effectuée par la 6 phosphogluconate déhydrogénase permettant d'obtenir à nouveau du NADPH nécessaire pour l'élimination de la GSSH.

Au pH le plus bas (pH 2,8), le métabolisme de la biosynthèse des acides gras change subitement d'expression générale en activant la synthèse des AG membranaires ce qui peut se traduire par une baisse de la perméabilité aux protons et donc une meilleure résistance à l'acidité. Il y a également une forte activation de plusieurs de mécanismes de réponse aux stress comme l'ATP synthase ou encore la réparation des dommages liés au stress au niveau de l'ARN et de l'ADN.

Enfin, l'activation du système GSH avec l'entrée du glutathion dans la cellule et la sur-expression de la réaction d'oxydoréduction par la GshR et la Gpo dans cette condition de stress pourrait jouer un rôle de protection contre le stress oxydatif et permettre son adaptation au milieu.

III.2. Essai de protéomique quantitative pour l'identification des mécanismes d'adaptation à l'acidité du vin

Suite à l'essai préliminaire décrit précédemment, nous avons utilisé la même stratégie de protéomique quantitative pour analyser les mécanismes de résistance à l'acidité mis en jeu par une souche commerciale inoculée dans un vin. Les tests ont été réalisés avec la souche LAL01, en version liquide, qui a été inoculée dans un vin blanc de Chardonnay ajusté à pH 3,3 ou pH 4 (EP n°2). Cette souche a été choisie, car elle était la plus tolérante à l'acidité dans les tests présentés en début de chapitre. Elle se développe bien dans le vin à pH 3,3, en particulier sous forme liquide, alors que toutes les autres souches testées sont plus ou moins fortement inhibées à ce pH. Elle a également été inoculée dans le même vin à pH 4, qui représente un stress beaucoup moins important, car il est parfaitement toléré par toutes les souches testées. La comparaison des protéomes à pH 3,3 et pH 4,0 devrait donc permettre d'identifier les mécanismes de résistance à l'acidité spécifiquement mis en place par cette souche. L'incubation dans les deux vins a été réalisée en triplicata. Après 7 jours d'incubation, les cellules bactériennes ont été collectées, puis les protéines ont été extraites et quantifiées par la méthode iTRAQ en 6-plex, chaque réplicat biologique étant analysé séparément.

Les résultats bruts d'analyse protéomique ont révélé un total de 619 protéines identifiées avec au moins un peptide dans chacun des 6 échantillons. Le génome de la bactérie avait été préalablement assemblé en 31 contigs, pour un total de 1,758,678 pb et son annotation avait montré 1875 séquences codantes (Campbell-Sills, communication personnelle). Ce sont donc 33 % des séquences codantes qui ont été identifiées. La quantification a été réalisée sur les protéines identifiées avec au moins 2 peptides, soit 533 protéines, qui représentent 28,4 % des

séquences codantes de la bactérie. L'ensemble des résultats est présenté dans l'Annexe 3 et synthétisé dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Données de quantification des 533 protéines de la souche LAL01 dans un vin blanc à pH 3,3/pH 4.

	Min	Max	Moyenne
Peptides utilisés (par protéine)	2	71	8,5
Variabilité des 3 réplicats à pH 3,3 (%)	0,1	19,7	4,8
Variabilité des 3 réplicats à pH 4,0 (%)	0,3	18,9	7,6
Ratio de quantification (pH 3,3 /pH 4,0)	0,42	3,36	1,4
p-value des ratios de quantification (test de Student)	0,000	0,997	0,160

De 2 à 71 peptides qui ont été quantifiés pour chaque protéine. La variabilité moyenne des résultats de quantification entre les 3 réplicats à pH 3,3 et 4,0 était de 4,8 % et 7,6 %, respectivement, ce qui montre une bonne reproductibilité de la plupart des valeurs de quantification obtenues pour les 3 réplicats biologiques. Le ratio des quantifications de chaque protéine dans les 2 conditions (pH 3,3 /pH 4,0) varie de 0,42 à 3,36. Les valeurs inférieures à 0,8 ou supérieures à 1,2 correspondent aux protéines sous-exprimées ou sur-exprimées, respectivement. Néanmoins, celles pour lesquelles l'analyse statistique des données de quantification des réplicats n'est pas confirmée par un test de student (p value > 0,05) n'ont pas été considérées par la suite. Finalement, 43 protéines significativement sous-exprimées ont été retenues (ratio pH 3,3 /pH 4,0 < 0,8 et p -value < 0,05), ainsi que 193 protéines sur-exprimées (ratio pH 3,3 /pH 4,0 > 1,2 et p -value < 0,05).

Les protéines significativement sur- ou sous-exprimées ont été recherchées dans les voies métaboliques de la base de données de KEGG par comparaison avec celles de la souche *O. oeni* PSU-1. Les nombres de protéines affectées à chaque voie sont représentés dans la Figure 61. Certaines protéines n'ont pas pu être positionnées dans ces voies, car il n'existe n'y a pas de protéines similaires codées chez la souche PSU-1. Elles sont listées dans le Tableau 13.

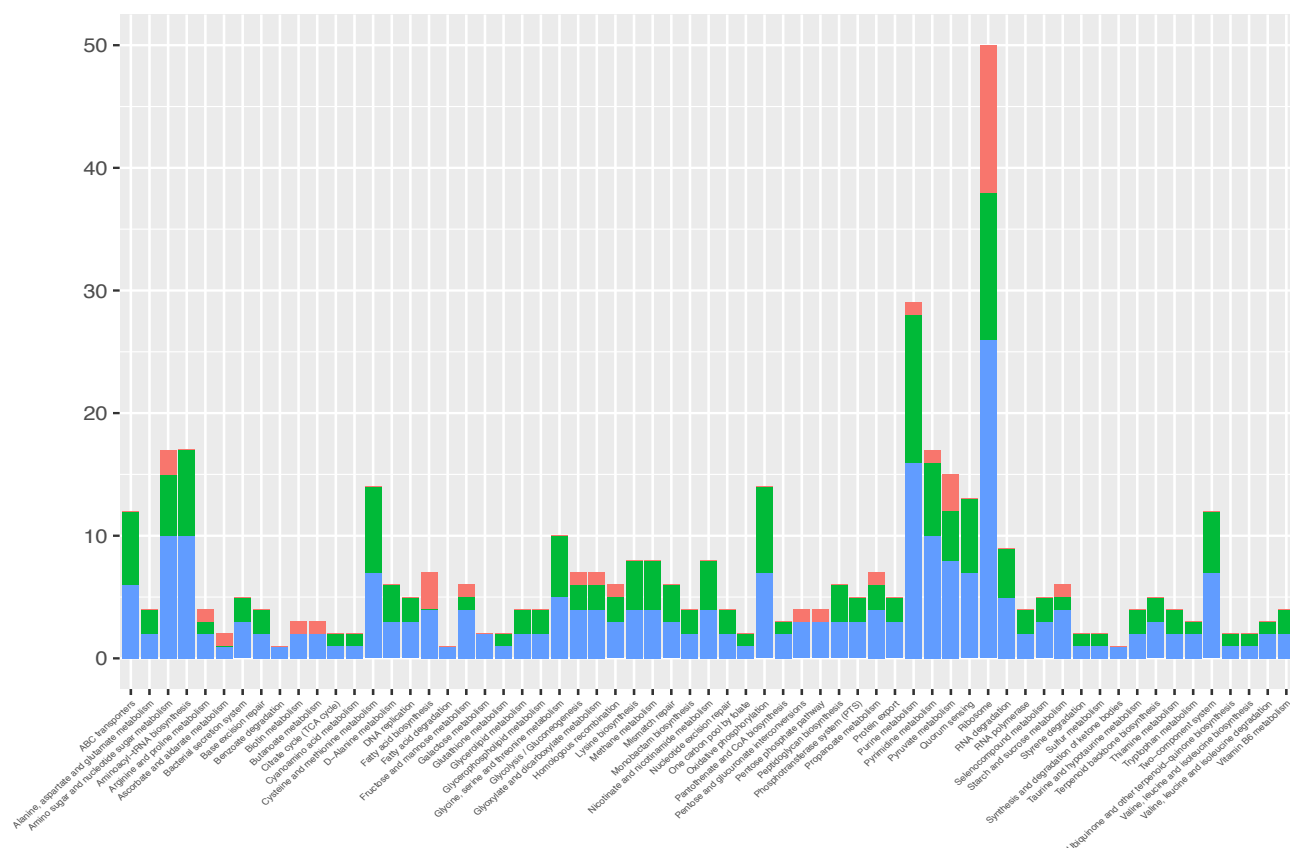


Figure 61 : Distribution dans des voies métaboliques de KEGG des protéines de la souche LAL01 sur- ou sous-exprimées à pH 3,3 versus pH 4.

Les protéines de la souche LAL01 significativement sur- ou sous-exprimées lors de l'exposition dans un vin blanc à pH 3,3 versus pH 4 ont été identifiées et quantifiées par la méthode iTRAQ et affectées sur les voies métaboliques de KEGG. Les couleurs des histogrammes représentent leur niveau d'expression: protéines sur-exprimées avec un ratio supérieur à 1,2 (en vert), sous-exprimé avec un ratio inférieur à 0,8 (en rouge), et sans changement d'expression (en bleu). La hauteur des histogrammes représente le nombre de protéines.

Tableau 13 : Liste des protéines de la souche LAL01 sur- ou sous-exprimées à pH 3,3 /pH 4,0 et non codées par la souche de PSU1.

N° accession	Description	Ratio de quantification pH 3,3/4,0	p- value
A0NI56	Fructose-bisphosphate aldolase	2,818	0,012
A0NIW7	Integral component of membrane	1,449	0,001
A0NK16	Nicotinate phosphoribosyltransferase	1,502	0,042
D3L852	Elongation factor 4 gene lepA	1,470	0,035
D3LBD0	Polyphosphate kinase	1,260	0,043
D3LBG1	Integral component of membrane	0,800	0,012
Q8VW55	Ornithine carbamoyltransferase, arcB	0,689	0,009

Globalement, le nombre de protéines identifiées pour chaque voie métabolique est plus faible que lors de l'essai préliminaire réalisé dans le moût. Par exemple, plus de 40 protéines de la catégorie « ABC transporteurs » avaient été identifiées dans l'essai précédent, alors que ce sont

seulement 12 protéines dans l'essai réalisé avec la souche LAL01 dans le vin. Il est probable que l'expression protéique des souches d'*O. oeni* soit différente dans ces deux environnements, mais ces variations sont également liées à l'utilisation de deux souches différentes dans ces essais (CRBO 14217 et LAL01) et au fait que toutes les protéines identifiées ont été comptabilisées lors du premier essai, alors que ce sont seulement celles dont la quantification est significative dans le cas de la souche LAL01. La Figure 61 montre également que la quasi-totalité des voies métaboliques contiennent des protéines sur-exprimées. Les variations les plus nombreuses sont observées au niveau des protéines ribosomiques, du métabolisme des purines, de certains acides aminés et de la phosphorylation oxydative. Ces observations sont confirmées lorsqu'on effectue un test d'enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression significatif (Figure 62).

La capacité de néosynthétiser des protéines est particulièrement affectée selon le pH du vin. En effet, la Figure 62 montre que de nombreuses protéines ribosomiques sont sous-exprimées, comme S10, L3, L23, S19, L22, L24, L18, S5, S7, L9, S16, S20, tandis que d'autres sont sur-exprimées, comme L2, L29, L14, S8, S11, L10, L11, S2, L31, S18, S6, L23. D'autres protéines de la traduction sont également sur-exprimées, comme les facteurs d'initiation (IF2 et IF3), les facteurs d'élongations (EF-Tu, EF-4, EFG, EF-Ts, EF-P) et les facteurs de terminaison (RF-2 et RF-3), mais également plusieurs aminoacyl-tRNA synthétases spécifiques de la lysine, la glycine, l'arginine, l'aspartate, l'asparagine ou la proline. Parallèlement à cela, les voies métaboliques de nombreux acides aminés contiennent des protéines sur-exprimées. En particulier celles de la cystéine et de la méthionine qui ont de nombreuses protéines sur-exprimées, comme la cystéine synthase, la cystathione gamma lyase, la S-adénosylméthionine synthase, la S-ribosylhomocystéine lyase, l'adenosylhomocystéine nucleosidase, l'aspartate-semialdehyde dehydrogenase et une aminotransférase d'acides aminés branchés. De plus, 7 peptidases ou sous unités de ces enzymes sont sur-exprimées, ainsi que plusieurs transporteurs membranaires de peptides ou d'acides aminés, ce qui suggère que la bactérie a un besoin important d'acides aminés lorsqu'elle est exposée à pH 3,3.

La régulation de la biosynthèse du peptidoglycane est également modifiée en fonction du pH du vin. En effet, plusieurs protéines sont sur-exprimées à pH 3,3. Il s'agit notamment de l'UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransférase, de la UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transférase ainsi que les trois enzymes liées à la D-alanine et la formation du pont peptidique : l'alanine racémase, la D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase et la D-alanine-D-alanine ligase (voir l'Annexe 3).

Divers changements surviennent au niveau du métabolisme des sucres. Il est particulièrement remarquable qu'une des protéines pour lesquelles le changement d'expression est le plus important entre pH 3,3 et pH 4,0 soit la fructose 1,6-bisphosphate aldolase (ratio pH 3,3/pH 4,0 de 2,82). Cette enzyme permet l'utilisation du fructose par la voie homofermentaire chez certaines souches d'*O. oeni* (Cibrario et al., 2016). D'autres protéines liées au métabolisme des sucres ou au métabolisme central sont sur-exprimées, par exemple la sucrose phosphorylase, la phosphoglycérate mutase, l'acétate kinase, la L-lactate déshydrogénase, des transporteurs de type PTS du tréhalose et du mannose (ManX) ou un transporteur type ABC spécifique de plusieurs sucres qui sont tous sur-exprimés. À l'inverse, la fructokinase, la phosphoglycérate kinase, la D-lactate déshydrogénase, la phosphate acétyl transférase ou la pyruvate oxydase sont réprimées.

La résistance à l'acidité du vin de la souche LAL01 pourrait donc être favorisée par des modifications du métabolisme des sucres, qui permet la production d'ATP et indirectement l'expulsion de protons intracellulaires. Cela serait cohérent avec l'observation que plusieurs sous unités de l'ATP synthétase sont sur-exprimées : les sous unités α , β , γ , et δ pour le complexe cytoplasmique F_1 , et b et c pour le complexe membranaire F_0 , ainsi que la pyrophosphatase inorganique. De nombreuses enzymes du métabolisme des purines sont également sur-exprimées et pourraient intervenir dans le maintien d'un pool d'ATP (Figure 61), par exemple l'adénylate kinase qui permet la régénération d'un ATP et un AMP à partir de 2 ADP.

D'autres protéines sur-exprimées peuvent également participer à la résistance au stress de la bactérie, comme une sous-unité de la citrate lyase, qui intervient dans le métabolisme du citrate, la thiorédoxine réductase, du métabolisme du glutathion, ou une protéine de réponse au choc alcalin. Il est également intéressant que la protéine dont le niveau d'expression est le plus modifié (ratio 3,35) est la protéine de réponse au stress universel de type « UspA-like » qui est connue pour participer à « l'endurance générale » au stress des bactéries.

On peut également observer l'activation de phénomènes de formation, dégradation et réparation de l'ARN et de l'ADN avec la sur-expression de la ribonucléase R, J et M5 (RNaseR, RNaseJ, RNaseM5), l'hélicase CshA, l'ARN polymérase sous unité α et β , l'exodeoribonuclease III et VI, l'ADN polymérase I et III sous partie α et l'hélicase UVRD.

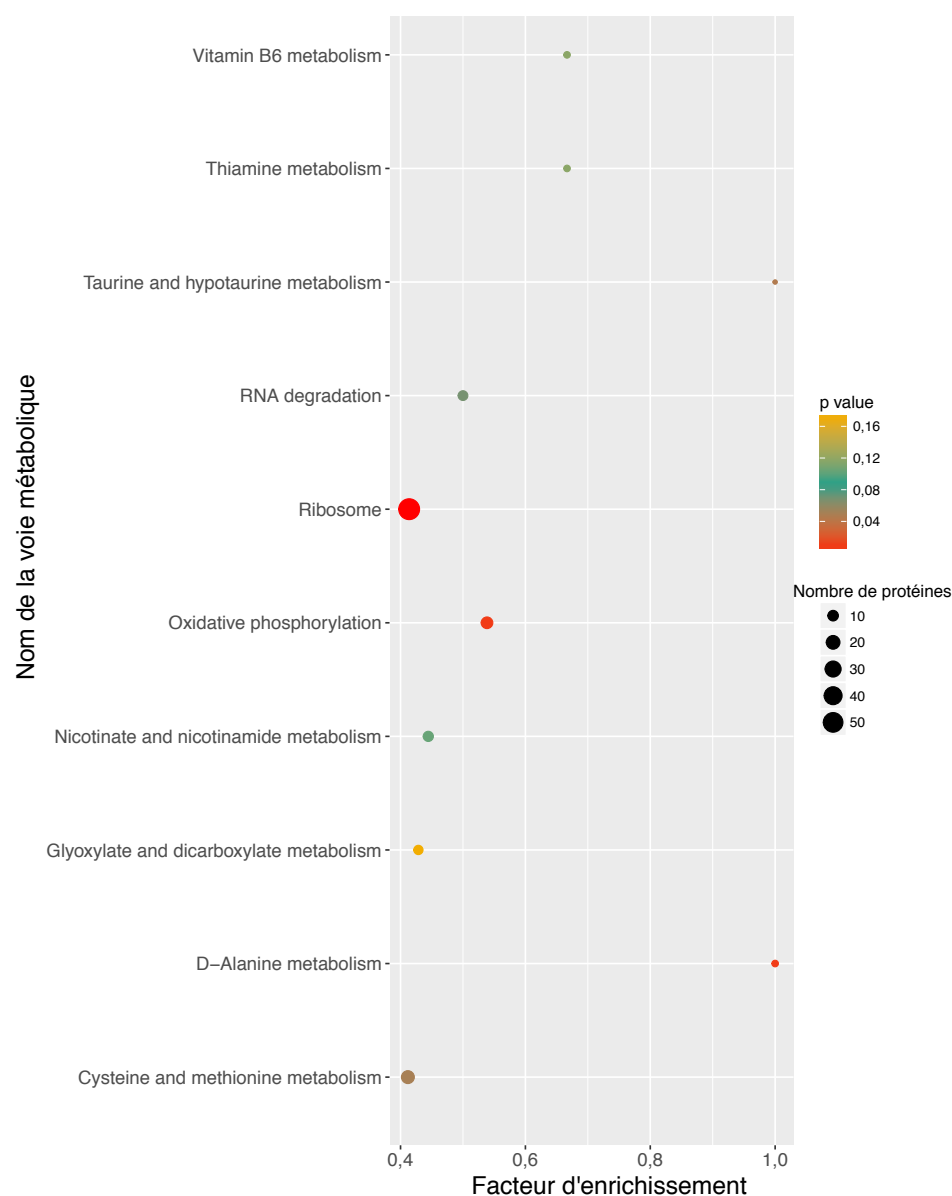


Figure 62 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress acide.

Le facteur d'enrichissement correspond au ratio du nombre de protéines ayant un changement d'expression sur le nombre total de protéines dans la voie métabolique étudiée. Les protéines ayant un ratio inférieur ou égal à 0,8 ou supérieur ou égal à 1,2 avec un p-value $p \leq 0,05$ ont été sélectionnées pour le test d'enrichissement effectué sur le logiciel R. Une p-value affectée à l'ensemble de la voie est ainsi calculée.

IV. Discussion

Dans un premier temps, nous avons souhaité caractériser les différences phénotypiques pouvant potentiellement exister entre des souches ayant été préparées par la lyophilisation et des cultures vis-à-vis des stress rencontrés dans le vin. Puis, dans un second temps, une étude des mécanismes moléculaires mis en place lors de l'adaptation à l'acidité chez une souche commerciale a été réalisée. Ces études s'inscrivent dans une démarche de compréhension des différences d'adaptation entre les souches *d'O. oeni* qu'elles soient sous forme de levains ou non. Les levains malolactiques sont sélectionnés selon des paramètres précis comme leurs capacités fermentaires, la non-production d'altérations, mais également selon leur résistance au processus de production (application de divers stress et lyophilisation). De nombreux auteurs ont en effet observé une amélioration de la survie des levains lors de pré acclimatation (culture en milieu acide, en présence d'éthanol, chauffage...) ou lors de l'utilisation de cryoprotectant (Zhao & Zhang, 2009b) (Bravo-Ferrada et al., 2015). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux différences phénotypiques dans le vin entre les deux modes de préparation des souches *d'O. oeni*.

Dans les différents tests phénotypiques effectués, on remarque une très bonne standardisation des souches commerciales lors du passage sous forme de levains même pour des souches d'origines variées. Néanmoins, les levains lyophilisés résistent peu à la diminution du pH. Les résultats de l'expérimentation sur l'effet de l'acidité sont étonnants et nécessiteraient d'être reproduit sur des vins différents venant d'être vinifiés. La forte mortalité observée chez les levains lyophilisés même au pH les plus élevés pourrait donc être due au temps de conservation trop long du vin à 4 °C ou à la présence de molécules chimiques inhibitrices comme les pesticides.

Dans les deux études protéomiques que nous avons effectuées sur l'effet de l'acidité sur les mécanismes de réponse et d'adaptation aux stress, nous avons utilisé deux souches génétiquement très différentes. La souche 14217 a été isolée du cidre et est selon les études phénotypiques réalisées lors des travaux de thèse de (Khoury, 2014) très résistante à l'acidité. Nous avons choisi de tester dans un premier temps cette souche dans des conditions se rapprochant de sa matrice d'origine c'est-à-dire avec peu d'éthanol et différents types de sucre selon des niveaux variables d'acidité (Trujillo, 2015). Puis la souche commerciale LAL01 isolée du vin rouge dans le Languedoc a été utilisée dans la deuxième expérimentation. La grande variabilité génétique et phénotypique entre ces deux souches ne nous permettra pas d'effectuer une généralisation à l'ensemble de l'espèce, mais bien d'identifier de potentiels nouveaux mécanismes dans la réponse au stress acide.

De manière générale, de nombreuses protéines ont été sur-exprimées lorsque le pH a diminué.

Transport et métabolisme des carbohydrates

Au niveau du métabolisme central de la cellule, l'augmentation de l'acidité entraîne une activation du métabolisme énergétique. Chez la souche 14217, à un pH 2,8 il y a une forte sur-expression de l'entrée de différents types de sucres comme le galactose, le tréhalose et le mannose, ainsi que des enzymes permettant leur transformation en substrats énergétiques utilisables pour le mécanisme cellulaire. De la même manière dans le vin, la souche LAL01 lorsque le pH diminue, active l'entrée des sucres (tréhalose, mannose...). Selon (Cibrario et al., 2016), *O. oeni* serait capable d'utiliser de nombreux sucres de par son évolution adaptative au développement dans le vin avec la consommation de carbohydrates provenant de l'autolyse des levures ou encore de ceux provenant du raisin (cellobiose et β -glucosides). En condition acide, les deux souches étudiées semblent favoriser l'entrée de multiples sources de carbohydrate pour un apport énergétique supplémentaire.

Glycolyse et voie des pentoses phosphate

Les enzymes impliquées dans la glycolyse ont en fonction de la souche et du niveau d'acidité des expressions différentes. De manière surprenante la fructose biphosphate aldolase (Fba) est sur-exprimée dans de nombreuses conditions (EP n° 1 pH 3,3 et pH 3 et EP n° 2). Dans la condition de pH la plus basse, la souche 14217 ne sur-exprime pas la Fba, mais la Fruk.

L'enzyme Fba qui appartient au métabolisme homofermentaire permet la transformation du fructose-1,6-bisphosphate en deux molécules de D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et une molécule de dihydroacétone phosphate. Cette voie appelée Embden Meyerhof est plus énergétique que la voie des pentoses phosphate avec la formation de quatre molécules d'ATP. Cette voie nécessiterait pour être fonctionnelle l'entrée du fructose via un transporteur spécifique type PTS ainsi que la présence d'enzymes telles que la phosphofructokinase (FruK), la triose-phosphate isomérase (Tpi) et la Fba (Cibrario et al., 2016). Chez les souches 14217 et LAL01, les trois gènes sont présents dans le génome (*fruK1*, *tpi* et *fba*) ainsi que le transporteur spécifique du fructose permettant la production de fructose 1-phosphate dans le milieu intracellulaire.

On peut donc penser qu'en conditions de stress, la cellule modifie son métabolisme vers la voie de Embden Meyerhof, plus énergétique, ce qui se traduit généralement par la consommation de fructose et la sur-expression de l'enzyme centrale à cette voie la Fba. Chez *Lactobacillus brevis*, une modification de leur métabolisme hétérofermentaire vers la voie homofermentaire Embden Meyerhof lors de la présence de fructose dans le milieu et d'une anaérobiose a pu être observé (Saier et al., 1996). De même chez d'autres espèces *Lactobacillus reuteri* (Årsköld et al., 2008), *Lactobacillus panis* (Kang et al., 2013), *Lactobacillus plantarum* en condition de stress (Pieterse

et al., 2005), on observe une utilisation double entre la voie des pentoses phosphates et la voie de la glycolyse, passant de l'une à l'autre en fonction des conditions.

Traduction, structure ribosomale et biosynthèse

La synthèse protéique dans l'EP n° 2 qui est effectuée par les ribosomes, semble être activée avec la sur-expression des facteurs d'initiation (IF2 et IF3), les facteurs d'élongations (EF-Tu, EF-4, EFG, EF-Ts, EF-P) et les facteurs de terminaison (RF-2 et RF-3). Les différentes protéines ribosomales présentent elles des niveaux d'expression variables avec les protéines S10, L3, L23, S19, L22, L24, L18, S5, S7, L9, S16, S20 sous-exprimées tandis que d'autres sont sur-exprimées comme L2, L29, L14, S8, S11, L10, L11, S2, L31, S18, S6, L23. De nombreux aminoacyl ARNt nécessaires à la synthèse protéique sont eux également sur-exprimés dans l'EP n° 2 ce qui est en corrélation avec une autre étude protéomique sur la résistance au stress chez *L. casei* Zhang (Wu et al., 2012). D'autres travaux ont également observé la sur-expression de nombreuses protéines ribosomales chez *O. oeni* après inoculation ou une adaptation dans un milieu modèle de vin (Cecconi et al., 2009) (Margalef-Català et al., 2016a).

De plus, on remarque que le métabolisme de la cystéine et de la méthionine sont fortement activés dans cette étude par exemple la cystéine synthase qui est sur-exprimée à pH 3,3 /pH 4 dans le vin, ainsi qu'à pH 3 dans le moût, mais sous-exprimée à pH 2,8. La cystéine est un acide aminé essentiel jouant un rôle vital dans les fonctions catalytiques et la structure de nombreuses protéines. Lithgow et ses collègues ont montré que la présence de la cystéine synthase avait un rôle essentiel chez *Staphylococcus aureus* dans la synthèse protéique et qu'une mutation de ce gène entraînait une augmentation de la sensibilité aux stress (Peroxyde d'hydrogène, acidité, etc) (Lithgow et al., 2004).

Métabolisme du citrate et du malate

Au niveau du métabolisme secondaire, on remarque que dans toutes les conditions, une ou plusieurs enzymes de l'opéron citrate sont sur-exprimées (sauf EP n° 1 pH 2,8). Olguín et al. (2009) n'ont eux cependant pas observé d'activation de l'opéron citrate lors de conditions acides, mais plutôt lors de la présence d'éthanol.

En ce qui concerne la fermentation malolactique et son rôle dans la résistance à l'acidité, on n'observe pas dans les conditions les plus acides de sur-expression de l'enzyme malolactique contrairement à d'autres travaux aussi effectués en conditions de stress (Olguín et al., 2009) (Olguín et al., 2010) (Bordas et al., 2015) (Costantini et al., 2015) (Margalef-Català et al., 2016a).

Métabolisme des lipides

Chez la souche 14217, le passage de pH 3 à pH 2,8 entraîne un passage de la répression de la biosynthèse des acides gras à son activation (acétyl-CoA carboxylase ACC, FabD, FabH et FabF). Chez la souche LAL01, certaines protéines de cette voie sont sous-exprimées à pH 3,3 /pH4 (fabZ et FabK) alors que chez 14 217, il s'agit les protéines FabF et FabG à pH 3 et l'ACC, FabDHF à pH3,3.

La première étape de la synthèse des acides gras est la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA par l'enzyme ACC puis celui-ci est transféré sur une protéine transporteuse d'acyl par FabD. FabH permet d'initier la formation d'une nouvelle chaîne acyle à partir de malonyl-ACP et d'acétyl-CoA. L'enzyme FabF permet l'élongation de la chaîne des acides gras, FabG va ensuite réduire la molécule précédemment formée puis FabZ par une déshydratation va créer une insaturation de l'acide gras. Enfin, FabK va terminer le cycle de l'élongation. La régulation de cette voie est effectuée chez les bactéries par les acides gras à longue chaîne principalement sur l'ACC et FabH limitant ainsi l'initiation et l'élongation des acides gras (Zhang & Rock, 2008).

On remarque donc qu'à pH 2,8, il y a une activation de l'initiation et de l'élongation de la synthèse des acides gras sans pour autant favoriser l'activation de la formation d'acides gras insaturés (FabZ) qui entraînent une fluidification de la membrane. On peut donc penser qu'il n'y a plus d'inhibition par les acides gras à longue chaîne présents. D'un autre côté, dans le vin à pH 3,3, la souche LAL01 semble, elle, plutôt limiter la formation des acides gras insaturés et donc la fluidification de la membrane.

Réponses aux stress

En ce qui concerne les mécanismes de résistance connus, on observe l'activation de l'ATP synthase dans toutes les conditions testées (sauf celles de l'EP n° 1 à pH3,3). La sur-expression des différentes sous unités de l'ATP synthase a été largement observée dans différentes études sur la réponse aux stress (Costantini et al., 2015) (Liu et al., 2017) ce qui est en corrélation avec son rôle chez *O. oeni* lors de la FML (Fortier et al., 2003). Néanmoins, cette activation n'est pas généralisée à toutes les études. Ainsi, Margalef-Català et son équipe ont observé durant l'adaptation précoce (de 0,5 à 8 h) d'une souche d'*O. oeni* à un milieu synthétique de vin (12 % éthanol et pH 3,4) que différentes sous-unités de l'ATP synthase étaient sous-exprimées (Margalef-Català et al., 2016a).

De plus, l'abaissement du pH dans l'expérimentation n° 1 sur la souche 14217 entraîne l'activation du métabolisme du glutathion allant des transporteurs (CydC et D) en passant par la Gpo à la GshR. D'autres études protéomique et transcriptomique ont observé une augmentation de la présence de GshR lors de l'adaptation des cellules en présence d'éthanol (Silveira et al., 2004) (Cecconi et al., 2009) (Bordas et al., 2015).

Dans les deux études sur l'effet de l'acidité, on n'observe la sur-expression d'aucune protéine chaperone. On peut penser que celles-ci ont été sur-exprimées en amont du moment de récupération des cellules (7 jours). En effet, la sur-expression de diverses protéines chaperones (GroES, GroEL, Hsp10) a été observée très peu de temps après l'inoculation (1 h et 6 h) par (Margalef-Català et al., 2016a) ou encore Hsp20 après 1 h en condition acide (Liu et al., 2017).

Biosynthèse de la membrane et de la paroi

Une forte activation à partir de l'aspartate du métabolisme de la lysine a été observée dans les conditions les plus stressantes (EP n° 1 pH 2,8 et 3, EP n° 2 pH 3,3) avec la sur-expression d'enzyme permettant la production de composés nécessaires à la biosynthèse du peptidoglycane. De plus, dans le vin à pH bas, il y a une forte activation du métabolisme de l'alanine (Alanine racémase, Ddl et DltC) permettant la biosynthèse de peptidoglycane (avec les enzymes spécifiques à cette voie MurA et MurG) ou encore d'acides teichoïques. D'autre part, il y a une forte activation des protéines de la voie des sucres et nucléotiques aminés surtout au pH les plus bas (EP n° 1 pH 2,8 et 3, EP n° 2 pH 3,3) comme la glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransférase et MurQ. Chez un mutant résistant à l'acidité de la souche *Lactobacillus casei* Zhang, trois protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane (Ddl, MurA et MurG) sont sur-exprimées lors de choc acide en comparaison avec la souche wild type (Wu et al., 2012).

Cette activation pourrait donc être soit un mécanisme de résistance par une modification ou une augmentation de la taille du peptidoglycane soit un mécanisme de réparation des dommages liés à l'acidité.

Réplication ADN, synthèse d'ARN et systèmes de réparation

Dans le vin, la souche LAL01 active la synthèse d'ARN via l'ARN polymérase sous unité α et β ainsi que la réplication de l'ADN (ADN polymérase I et III sous partie α). De plus, de nombreux systèmes de réparation de l'ARN et de l'ADN sont également sur-exprimés lorsque le pH est soit suffisamment bas soit en combinaison avec d'autres stress (matrice vin EP n° 2 pH 3,3/pH 4) permettant ainsi de limiter l'impact délétère de l'acidité. Chez la souche LAL01 dans le vin à pH 3,3, il y a la sur-expression des protéines impliquées dans la dégradation de l'ARN comme la ribonucléase R, J et M5 (RNaseR, RNaseJ, RNaseM5) et l'hélicase CshA. L'hélicase UVRD et l'exodeoribonuclease III et VI sont impliquées dans l'excision de nucléotide et leur réparation et sont également sur-exprimées. De manière similaire de nombreuses protéines de réparation d'erreur au niveau de l'ADN ont également été sur-exprimées lors de stress acide chez *L. casei* Zhang que se soit la souche mutante et la souche wild type (Wu et al., 2012).

À pH 2,8 la souche 14217 dans le moût présente seulement une sur-expression d'une hélicase et de l'exinuclease UVRA. Un mutant de *Streptococcus mutans* au niveau du gène *uvrA* présente une

capacité réduite à résister au stress acide et son ADN est plus dégradé lors de son exposition comparée à la souche wild type (Hanna et al., 2001).

On remarque que les mécanismes traditionnellement identifiés comme participant à la résistance aux stress comme les gènes de l'opéron citrate ou malate n'apparaissent que très peu dans les deux études de protéomique contrairement à d'autres études (Olguín et al., 2009) (Olguín et al., 2010) (Bordas et al., 2015) (Costantini et al., 2015) (Margalef-Català et al., 2016a) (Sternes et al., 2017). Il est donc intéressant de voir que de nombreux autres systèmes sont mis en place par les souches d'*O. oeni* pour résister à l'acidité notamment chez la souche LAL01 comme le résume le schéma de la Figure 63.

Adaptation à long terme au pH faible

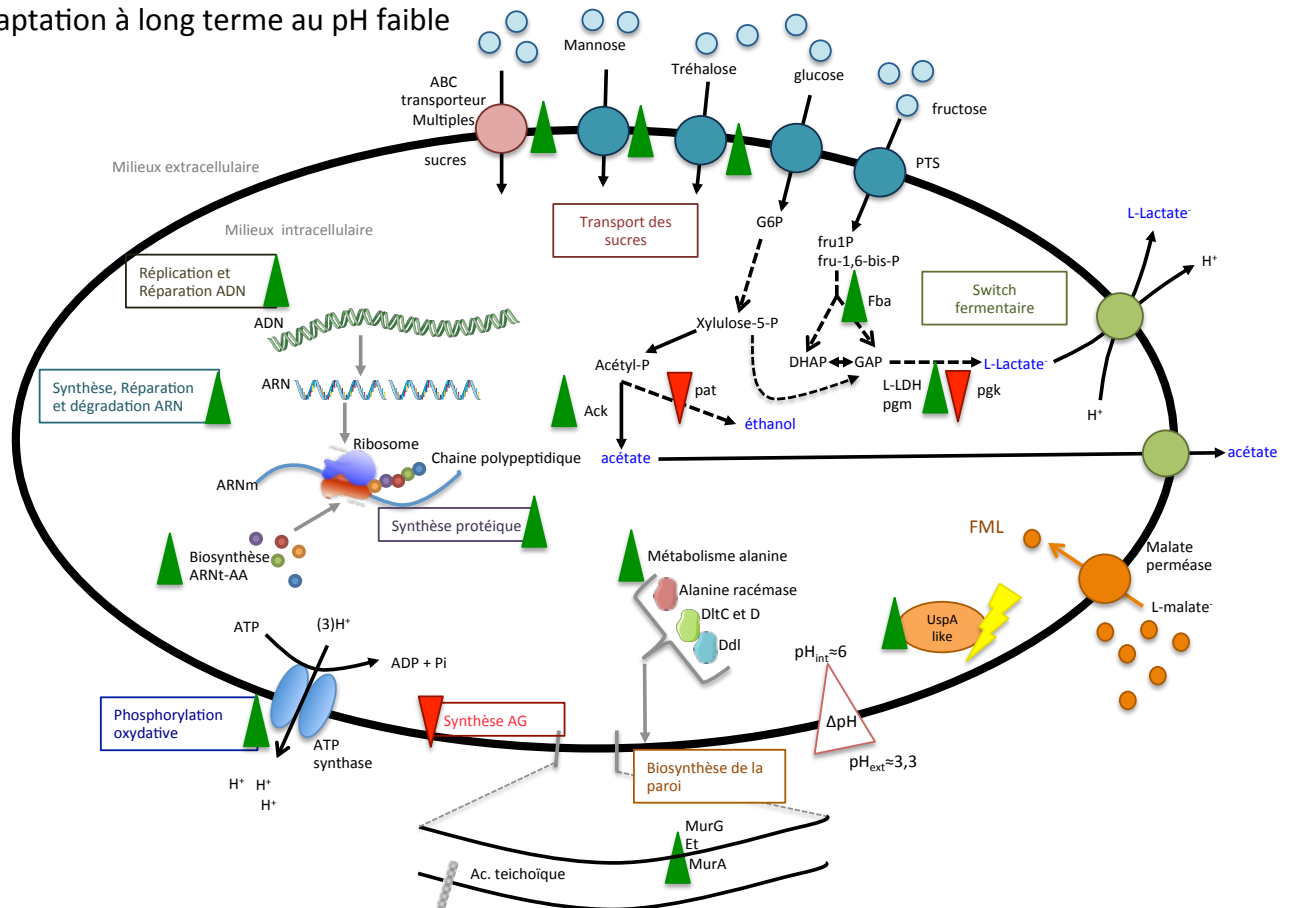


Figure 63 : Représentation schématique des principaux mécanismes mis en place par la souche d'*O. oeni* LAL01 lors de l'adaptation à long terme dans un vin blanc acide.

Chapitre 3 : Étude de la tolérance aux polyphénols de souches d'*O. oeni* industrielles

I. Objectif et choix des souches testées

Dans le chapitre 1, nous avons montré que les souches d'*O. oeni* appartenant à différents groupes génétiques sont plus ou moins tolérantes à la présence des composés phénoliques dans le vin. Dans cette partie, nous avons souhaité poursuivre ces travaux dans l'objectif d'identifier les mécanismes mis en jeu par certaines souches pour résister à la présence de polyphénols. Nous avons choisi d'analyser ces mécanismes chez des souches commerciales, car elles sont utilisées en conditions réelles de vinification depuis plusieurs années et leurs capacités à survivre et réaliser la FML dans des vins plus ou moins riches en polyphénols sont connues empiriquement. Au contraire, les souches des groupes VR et VB décrites au chapitre 1 n'ont été testées que dans des conditions de laboratoire. Leur comportement en conditions réelles de vinification n'a pas été étudié. Parmi les souches commerciales mises à notre disposition, la souche LAB6 est reconnue pour sa tolérance à différents types de vins et sa capacité à réaliser la FML rapidement (Tableau 10). Nous avons donc choisi de l'étudier et de la comparer à d'autres souches commerciales.

Nous avons commencé ce travail en comparant la tolérance aux composés phénoliques de plusieurs souches, puis la réponse des bactéries à ces composés a été analysée par des observations en microscopie électronique et par protéomique quantitative. Dans un premier temps, nous avons envisagé d'analyser les variations d'expression génétique en présence de polyphénols par une approche de RNAseq. Cependant, les essais réalisés n'ont pas été concluants. Nous avons donc utilisé la protéomique quantitative avec un protocole de purification des protéines spécifiquement mis au point pour cette étude.

II. Évaluation de la tolérance aux polyphénols de souches commerciales

II.1. Capacités fermentaires en présence de polyphénols de l'extrait T1

Dans un premier temps, nous avons analysé les capacités fermentaires de la souche LAB6 et de deux autres souches peu adaptées aux vins rouges. Elles ont été testées en conditions de laboratoire, dans un vin supplémenté avec différentes concentrations de l'extrait T1 (Tableau 5).

Bien que cet extrait ne soit pas le plus inhibiteur des 3 qui ont été testés dans le chapitre 1, il a induit une certaine inhibition des bactéries lorsqu'il était utilisé à une teneur importante (5 g/l). Il présente également l'avantage de contenir une plus grande diversité de composés phénoliques que les 2 autres extraits. Pour tenter d'induire une inhibition des bactéries, il a été utilisé à des concentrations de 0 à 10 g/L.

La Figure 64 montre les cinétiques de fermentation des trois souches testées : LACHT18, une souche isolée du champagne ; LAD1, une souche isolée d'un vin blanc de Chardonnay de Bourgogne et LAB6, une souche isolée d'un vin rouge d'Italie.

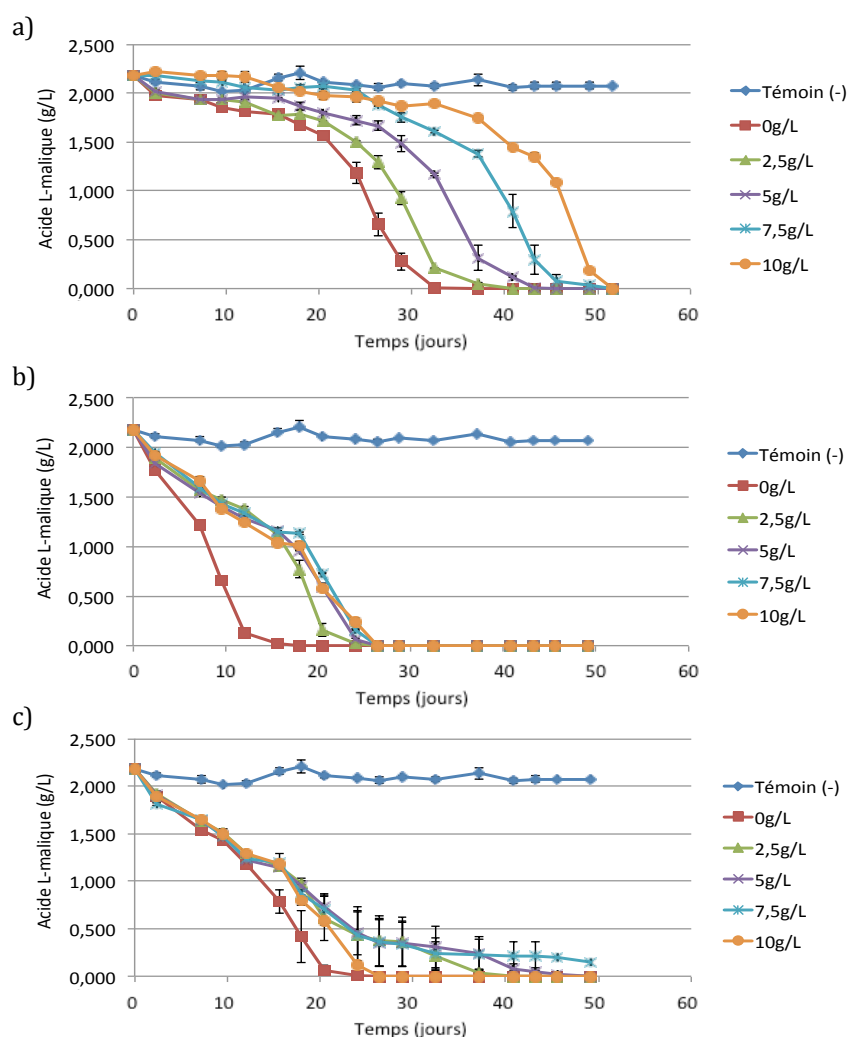


Figure 64 : Influence de la concentration en extrait polyphénolique T1 sur les cinétiques de fermentation de différentes souches commerciales.

Les souches commerciales LACHT18 (a), LAD1 (b) et LAB6 (c) ont été ensemencées dans un vin rouge (VR2) à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml selon le protocole industriel MBR®. Les cinétiques de dégradation de l'acide L-malique correspondent à un témoin non ensemencé (bleu foncé), à 0 g/L (rouge), 2,5 g/L (vert), 5 g/L (violet), 7,5 g/L (bleu ciel), 10 g/L (orange) de T1 ajouté. Les essais et les dosages ont été effectués en triplicata. Chaque point représente les valeurs moyennes obtenues pour les triplicatas, ainsi que les écarts types.

La souche champenoise LACHT18 se distingue des deux autres par une durée de fermentation plus longue même dans la condition contrôle sans ajout de polyphénols. La totalité de l'acide L-malique a été dégradée dans ce cas en plus de 30 jours, contre environ 15 jours pour LAD1 et 20 jours pour LAB6. De plus, l'ajout des polyphénols de l'extrait T1 a un effet nettement plus important chez LACHT18 que chez les deux autres souches. Plus la concentration en produit ajouté est importante, plus la durée de réalisation de la FML est longue. Elle atteint plus de 50 jours avec 10 g/L de produit. Au contraire, les deux autres souches LAD1 et LAB6 sont peu affectées par la quantité de produits ajoutés. D'après ces résultats, il est certain que les souches ont des comportements différents vis-à-vis des polyphénols et de ceux présents dans l'extrait T1. Néanmoins, ce produit n'a pas été choisi pour la suite des travaux, car, quelle que soit la concentration utilisée, toutes les souches sont capables de le tolérer.

II.2. Évaluation de la tolérance de souches commerciales aux polyphénols de l'extrait T3

Les travaux du chapitre 1 ont montré que l'extrait T2 n'avait aucun impact sur les souches du groupe VB et VR, mais que l'extrait T3 avait un impact important et différent selon le groupe de souches. Par conséquent, nous avons choisi de tester ce dernier sur les souches commerciales. De plus, pour déterminer si la production industrielle des souches permet d'améliorer leur survie en présence de polyphénols, les tests ont été réalisés en comparant les deux modes de production des souches : production industrielle sous forme lyophilisée ou production au laboratoire en culture liquide. Les 5 souches testées sont LAB6 (isolée de vin rouge), LAD1, LAL01 et LAA1 (isolées de vins blancs), et LAB2013 (isolée de vin rosé).

La survie des souches cultivées en milieu liquide et des levains lyophilisés a été testée dans deux matrices différentes, un vin blanc de Chardonnay et un vin rouge de Pinot noir, supplémentés avec 0 ; 1 ; 2,5 ou 5 g/L d'extrait T3. Les vins utilisés pour ces essais sont différents de ceux précédemment utilisés pour l'étude de l'effet de l'acidité sur la survie des souches commerciales en fonction de leur mode de préparation (Tableau 4) : vin blanc N°1 et vin rouge N°3.

La Figure 65 présente les résultats des survies mesurées dans le vin blanc. Elle montre des différences significatives selon les souches, selon leurs modes de production et selon les concentrations de T3 utilisées. 48 h après l'inoculation, toutes les souches sous forme lyophilisée ont conservé à peu près le même niveau de population qu'au moment de l'inoculation, quelle que soit la concentration d'extrait T3. Par contre, sous forme liquide, seules les souches LAB6, LAD1 et LAL01 en présence de 1 g/l de T3 et LAB6 en présence de 2,5 g/L de T3 ont maintenu un niveau de population proche du niveau d'inoculation. Dans toutes les autres conditions, les bactéries ont plus ou moins fortement décliné.

Après 7 jours, les souches lyophilisées ont encore des niveaux de populations similaires, mais réduits d'un facteur d'environ 10 par rapport au niveau d'inoculation. Seule la souche LAD1 atteint des niveaux supérieurs aux autres à 0 et 1 g/L de T3. Cependant, cette diminution ne semble pas être liée à la présence des polyphénols, car les mêmes niveaux de populations sont mesurés dans toutes les conditions, y compris dans le vin non supplémenté en extrait T3. Les souches produites sous forme liquide ont des taux de survie qui sont encore très variables. Sans ajout de T3, elles se sont toutes développées à l'exception de LAA1. En présence de T3, les résultats sont les mêmes qu'après 48 h, à savoir que seules LAB6, LAD1 et LAL01 se sont développées en présence de 1 g/L et LAB6 est la seule qui résiste à un niveau significatif en présence de 2,5 g/L de T3. En présence de 5 g/L d'extrait T3, il y a une très nette différence entre les souches lyophilisées et sous forme liquide. Les premières ont des niveaux de population importants, supérieurs à 10 % du niveau initial, alors que toutes les souches sous forme liquide sont pratiquement indétectables.

Enfin, 14 jours après inoculation, la plupart des souches lyophilisées ont une survie très faible dans toutes les conditions, sauf la souche LAD1 à 0 et 1 g/L de T3 et toutes les souches liquides sont à des niveaux de populations similaires à ceux mesurés après 7 jours. Elles se sont bien développées dans le vin blanc seul, alors que seulement quelques souches ont résisté à la présence de 1 g/L de T3.

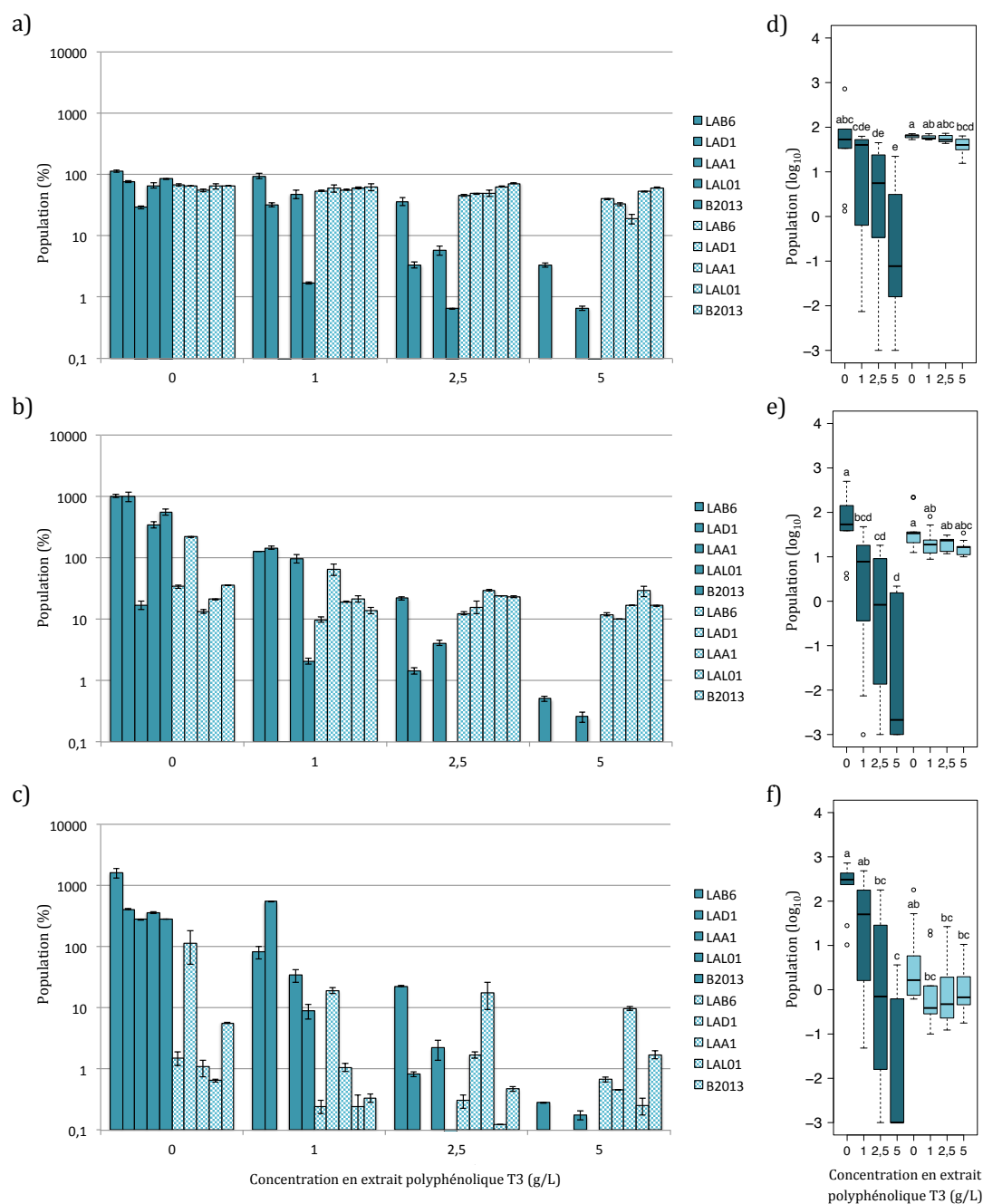


Figure 65 : Évolution des populations de souches commerciales produites sous forme liquide et lyophilisée et inoculées dans un vin blanc supplémenté en extrait T3.

Les souches commerciales en version liquide (en **bleu foncé**) et lyophilisées (en **bleu clair**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin blanc (N° 1) auquel ont été ajoutées différentes concentrations de l'extrait polyphénolique T3 (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 g/L), ainsi qu'un témoin sans ajout. Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé après 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours (c) et une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été réalisés en duplicatas. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés sous le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

Compte tenu des différences phénotypiques qui avaient déjà été remarquées dans les vins blancs et rouges (chapitres 1 et 2), des essais similaires ont été réalisés dans un vin rouge de cépage Pinot noir (Figure 66).

Le comportement des souches sous forme liquide est très comparable à celui qu'elles ont eu dans le vin blanc. En absence d'extrait T3, elles se sont maintenues à des niveaux de population importants et se sont même presque toutes développées au bout de 14 jours. En présence de l'extrait, elles ont eu des comportements variables. Certaines n'ont pas du tout survécu, même à la concentration la plus faible, alors que d'autres ont bien toléré la présence de 1 g/L d'extrait T3 (LAB6, LAD1 et LAL01) et même de 2,5 g/L pour LAB6 et LAL01. Ces souches ont donc eu des comportements tout à fait comparables à ceux observés dans le vin blanc. Au contraire, les souches lyophilisées ont eu des comportements très différents de celui noté dans le vin blanc. En effet, elles ont toutes très bien toléré l'inoculation dans ce vin rouge, même lorsque des polyphénols ont été ajoutés jusqu'à 5 g/L de T3. Leurs populations étaient sensiblement plus faibles à mesure que la concentration en extrait T3 augmentait, mais elles ont toujours été proches du niveau d'inoculation ou supérieures.

D'après ces tests, il est donc possible de tirer plusieurs conclusions :

- i) La souche LAB6 est bien adaptée au vin. Que ce soit sous forme liquide ou lyophilisée, dans le vin blanc ou le rouge, elle a bien toléré la plupart des conditions. Les souches LAD1 et LAL01 ont également bien résisté aux différents essais, mais les deux autres souches ont été beaucoup plus inhibées.
- ii) Le mode de production a une incidence majeure sur la survie de toutes les souches. La production lyophilisée augmente considérablement leur tolérance dans le vin rouge, et également dans le vin blanc, au moins au cours des premiers jours. De plus, ce mode de production induit une certaine standardisation des souches, car elles ont des comportements assez similaires dans toutes les conditions. Au contraire, les souches sous forme liquide ont des comportements très différents.
- iii) Le type de vin utilisé a une certaine influence sur le comportement des souches, en particulier sous forme lyophilisée. Il est remarquable que toutes les souches lyophilisées aient parfaitement bien toléré l'ajout de 5 g/L de T3 dans le vin rouge, alors qu'elles n'ont quasiment pas survécu dans les mêmes conditions dans le vin blanc. Cela suggère que le vin rouge pourrait contenir des composés qui favorisent leur survie.
- iv) Les composés phénoliques de l'extrait T3 ont bien un effet inhibiteur sur toutes ces bactéries. Cet effet est mesurable dès la concentration 1 g/L et il augmente proportionnellement avec la concentration ajoutée.

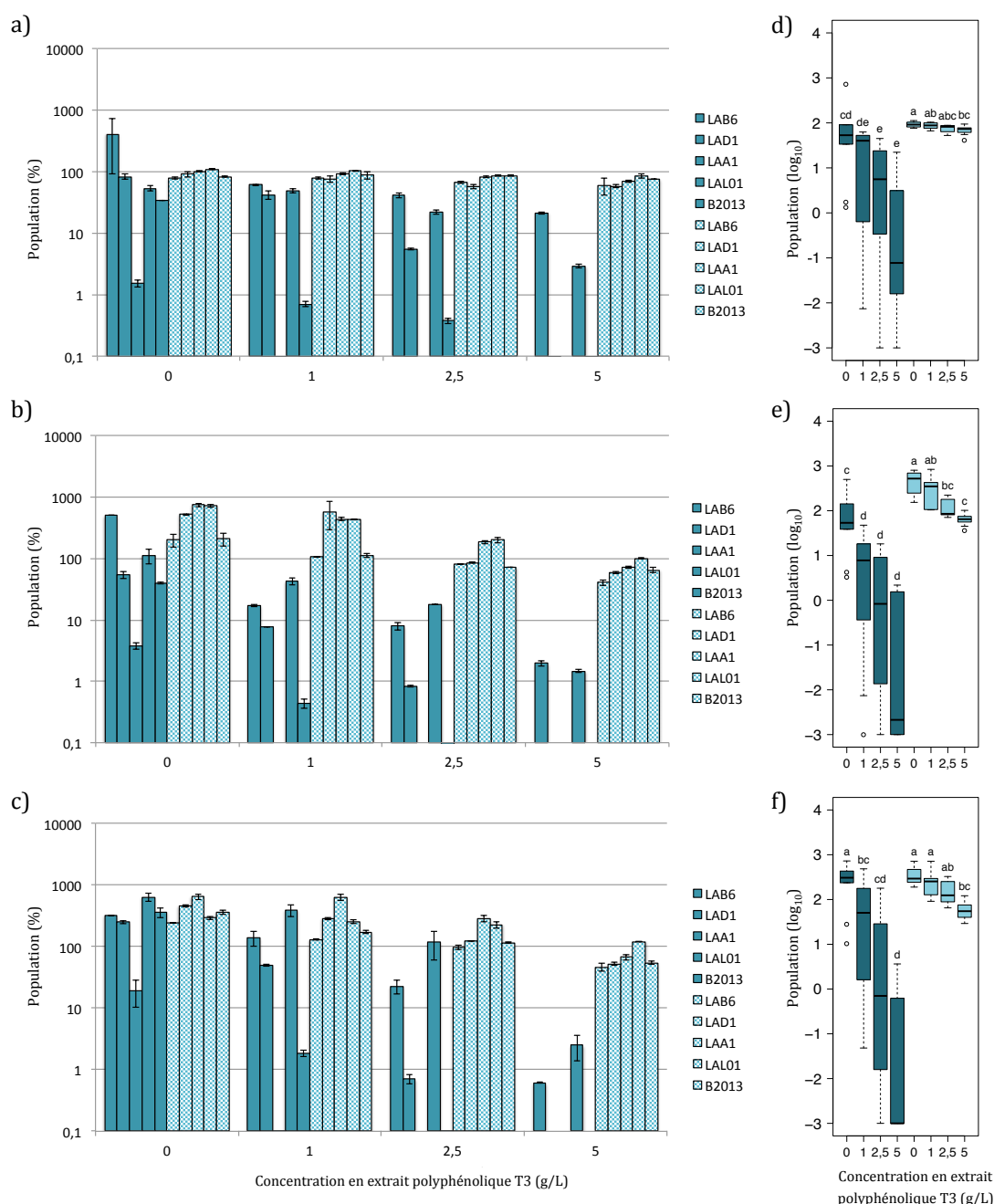


Figure 66 : Évolution des populations de souches commerciales produites sous forme liquide et lyophilisée et inoculées dans un vin rouge supplémenté en extrait T3.

Les souches commerciales en version liquide (en **bleu foncé**) et lyophilisées (en **bleu clair**) ont été inoculées à 2.10^6 cellules/ml (correspondant à 100 %) dans un vin rouge (N° 3) auquel ont été ajoutées différentes concentrations de l'extrait polyphénolique T3 (0 ; 1 ; 2,5 à 5 g/L), ainsi qu'un témoin sans ajout. Leur survie a été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé après 48 h (a), 7 jours (b) et 14 jours et une comparaison statistique entre les conditions a été effectuée à 48 h (d), 7 jours (e) et 14 jours (f). Les essais et les dénombrements ont été réalisés en duplicatas. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes obtenues pour les duplicatas, ainsi que les écarts types. Les boxplots ont été générés sous le logiciel R et le test statistique Kruskal Wallis a été utilisé avec un α de 0,05.

III. Analyse de l'effet des polyphénols sur la souche LAB6 par observation en microscopie électronique

Comme nous avons pu l'observer dans les résultats du chapitre 1, la présence d'EPS pourrait expliquer la meilleure résistance des souches du groupe VR dans le vin rouge. Nous avons donc recherché si la résistance importante de la souche LAB6 pouvait également provenir de ce type d'éléments. De plus, compte tenu des différences phénotypiques importantes mesurées entre les souches produites en version liquides et lyophilisées, nous avons souhaité observer les deux types de cellules pour rechercher si elles présentent des différences structurales. Elles ont été inoculées dans des vins blancs et rouges supplémentés ou non en extrait T3, puis observées par MET.

III.1.Observations au MET après exposition des cellules aux polyphénols

Les résultats pour la souche LAB6 en version liquide ou lyophilisée visualisés 7 jours après ensemencement dans différentes conditions : vin blanc seul ou additionné de 1 g/L d'extrait T3 (fraction oligomère) sont présentés dans la Figure 67.

On remarque que pour la souche LAB6 préparée en version liquide lorsqu'elle est ensemencée dans le vin blanc, les cellules ont une paroi très fine et la surface externe une structure homogène (Figure 67a). Cependant, l'ajout d'extrait polyphénolique T3 (1 g/L) dans le vin blanc semble entraîner l'apparition dans certains cas d'une zone claire peu dense aux électrons (paroi), ainsi qu'une structure plus diffuse et hétérogène au-delà de celle-ci.

Quand on ensemence la souche LAB6 lyophilisée dans le même vin blanc selon le protocole MBR® (Figure 67c), on remarque que la paroi des cellules est épaisse, peu dense aux électrons avec sur la partie la plus externe de la cellule des irrégularités. Les cellules observées sur les coupes effectuées sont majoritairement en division formant de longues chainettes.

Dans la condition avec un ajout de 1 g/L d'extrait T3 (Figure 67d), les cellules de la souche LAB6 lyophilisée présentent sur la partie externe de leur paroi une structure plus dense aux électrons qui dans certains cas s'étire dans le milieu extracellulaire.

Dans le vin rouge (Figure 68), la souche LAB6 en version liquide a une structure différente de celle observée dans le vin blanc. En effet, la Figure 68a montre des cellules de la souche LAB6 liquide ayant une paroi plus épaisse que celles observées dans le vin blanc. De plus, on remarque l'apparition d'une structure diffuse, non homogène liée à la paroi pouvant présenter une densité importante aux électrons. On peut également voir que les cellules ont parfois des prolongements

plus ou moins importants de la paroi vers le milieu extracellulaire. L'ajout de polyphénols supplémentaire dans le vin rouge avec l'extrait T3 à 1 g/L (Figure 68b) ne semble pas modifier fortement la morphologie des cellules de la souche LAB6 liquide en comparaison avec celle observée dans le vin blanc.

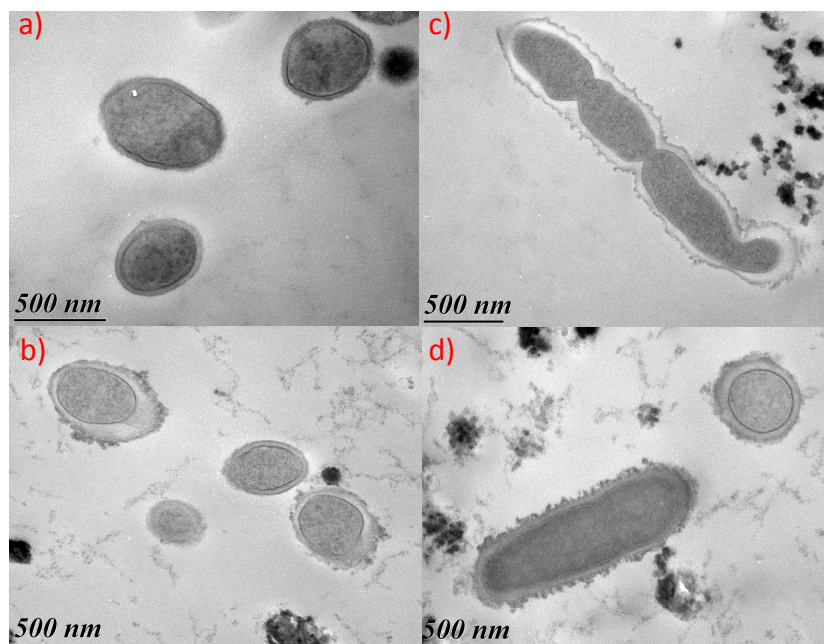


Figure 67 : Morphologie de la souche commerciale LAB6 en version liquide ou lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin blanc.

La souche LAB6 cultivée en milieu liquide (a et b) ou en version lyophilisée (c et d) a été ensemencée dans un vin blanc (N° 1) dont le pH a été rectifié (pH 3,6) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et c) et avec 1 g/L (b et d) d'extrait polyphénolique T3. Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

L'étude de la morphologie de la souche LAB6 lyophilisée ensemencée dans le vin rouge seul ou avec ajout d'extrait polyphénolique T3 est présentée dans la Figure 68c et d. Dans la condition où la souche lyophilisée est ensemencée dans le vin rouge seul, on observe une paroi épaisse moins dense aux électrons (zone claire) que le cytoplasme puis une zone externe plus dense ainsi que des amas de taille variable. Ces amas foncés semblent être liés aux cellules et se diffuser dans le milieu extracellulaire ou vers d'autres cellules. La souche lyophilisée semble être encapsulée par cette zone sombre.

Dans la condition avec ajout de 1 g/L de T3, on remarque que la paroi est toujours très épaisse bien que le grossissement soit plus important et peu dense aux électrons en comparaison avec la zone externe de la cellule. On peut donc se demander si ce changement de densité provient d'un changement de la composition du peptidoglycane du fait de la préparation des levains et si les complexes noirs externes sont composés d'EPS ou de complexe EPS/polyphénols.

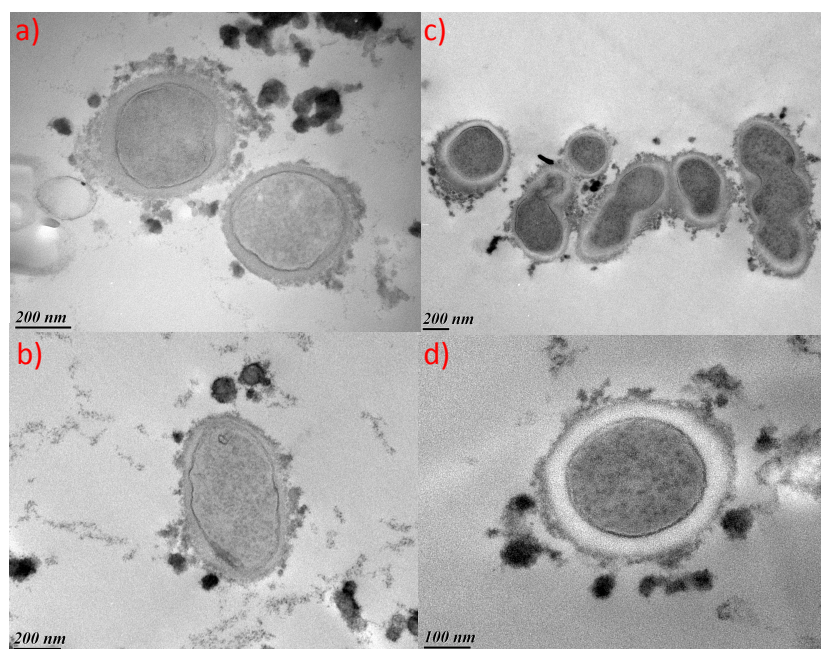


Figure 68 : Morphologie de la souche LAB6 en version liquide ou lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin rouge.

La souche LAB6 cultivée en milieu liquide (a et b) ou en version lyophilisée (c et d) a été ensemencée dans un vin rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH 3,6) dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et c) et avec 1 g/L (b et d) d'extrait polyphénolique T3. Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont été observées au MET en mode haut contraste.

On peut donc conclure qu'il existe une différence de morphologie des cellules entre les deux modes de préparation de la souche LAB6 ainsi qu'une modification possible de la composition de la paroi (changement de densité au MET) lors de la présence de polyphénols.

Cependant, des mesures de la taille de paroi comme celles effectuées dans la partie 1 auraient été nécessaires afin de valider ou non les changements observés entre la souche lyophilisée ou non et lors de l'ajout de polyphénols. Malheureusement, le faible nombre de clichés effectué au même grossissement n'a pas permis d'effectuer cette étude.

III.2.Observations après marquage spécifique des polysaccharides

Une recherche des polysaccharides par la réaction de Thierry a été effectuée afin de connaître la nature de la capsule et des amas externes à la paroi présente dans certaines des conditions comme lorsque la souche LAB6 lyophilisée est ensemencée dans le vin rouge (Figure 69). Cette technique a été précédemment utilisée dans d'autres études afin de rechercher des modifications de synthèse de polysaccharides par des bactéries (Andrés-Barrao et al., 2012) (Andrés-Barrao et al., 2015).

On remarque que dans toutes les conditions testées il y a de très nombreux précipités dus à la réaction de Thiery indiquant la présence de polysaccharides au niveau de ce qui semble être la membrane, de la paroi, mais également au niveau de la partie la plus externe de la cellule. Cette partie externe de taille variable peut donc être assimilée à une capsule voir dans certains cas de EPS par le prolongement important des précipités de la cellule au milieu extracellulaire. Dans la Figure 69 a et b correspondant à la modalité vin rouge seul, on observe clairement des précipités plus denses au niveau de cette partie externe avec de nombreux amas et de prolongements. Lorsqu'on ajoute l'extrait T3 (1 et 2,5 g/L), cette capsule polysaccharidique est toujours présente de taille plus ou moins variable.

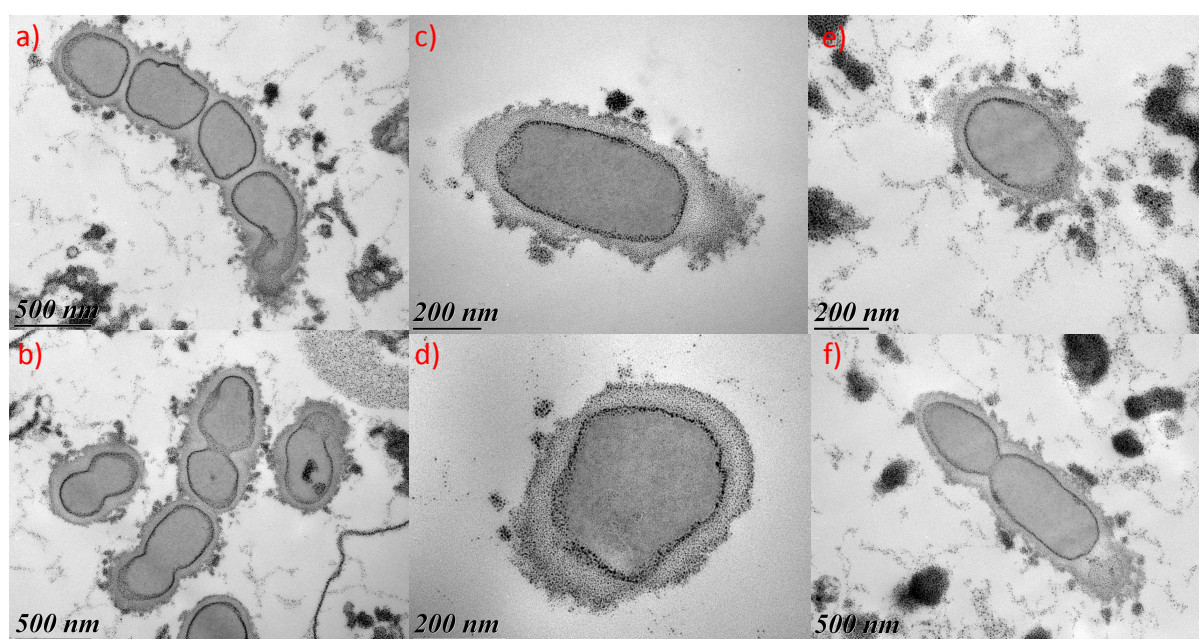


Figure 69 : Recherche de polysaccharides chez la souche LAB6 lyophilisée et influence de l'extrait T3 dans un vin rouge.

La souche LAB6 lyophilisée a étéensemencée dans un vin rouge (N° 3) dont le pH a été rectifié (pH 3,6) selon le protocole MBR®, dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (a et b), avec 1 g/L (c et d), 2,5 g/L (e et f) d'extrait polyphénolique T3. Les cellules ont été récoltées après 7 jours de contact. Les coupes ont subi la réaction de Thiery et été observées au MET en mode haut contraste.

La présence de polysaccharides produits par la souche LAB6 nécessiterait une confirmation par microscopie par balayage permettant une observation de la surface de la cellule, mais également des mesures de la concentration en CPS. Néanmoins, la présence de ses polysaccharides peut intervenir dans la résistance de la souche lors de contact avec les polyphénols.

IV. Analyse protéomique de la résistance aux polyphénols

IV.1. Mise au point d'une méthode d'analyse

Pour identifier les gènes et les voies métaboliques impliqués dans la résistance aux polyphénols, nous avons tout d'abord envisagé d'analyser l'expression de l'ensemble des gènes des bactéries par une approche de RNA seq. Cette approche a déjà été utilisée pour analyser le transcriptome de plusieurs espèces des bactéries lactiques cultivées dans divers environnements (Jin et al., 2012) (Liu et al., 2016) (van der Meulen et al., 2017) ainsi que chez *O. oeni* lors de FML dans le vin (Sternes et al., 2017) ou en milieu de culture (Liu et al., 2017). Elle nécessite de purifier des ARN totaux de très bonne qualité. Nous avons testé différentes méthodes d'extraction et de purification des ARNs de cellules d'*O. oeni* exposées dans un milieu supplémenté en extraits de polyphénols. Malheureusement, malgré les nombreux essais et tentatives d'optimisation, il n'a jamais été possible d'obtenir des ARNs totaux de qualité suffisante pour l'analyse en RNA seq (Annexe 7). Ces échecs étaient probablement dus aux interactions entre les ARNs et les polyphénols ajoutés, qui empêchent de réaliser une extraction efficace, ou d'obtenir des ARNs d'une pureté suffisante.

Compte tenu de ces difficultés, nous avons tenté d'utiliser une approche de protéomique quantitative. Les polyphénols pouvant également se lier aux protéines, plusieurs essais préparatoires ont été réalisés. La première tentative de quantification a été réalisée avec la souche 14215 inoculée dans un vin blanc en présence de 0 ou 5 g/L d'extrait T1. Les cellules ont été récupérées après 48 h de contact et les protéines ont été extraites selon le protocole classique décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'injection en LC-MS/MS des mêmes quantités de peptides préparés à partir des 2 échantillons à 0 ou 5 g/L d'extrait T1 a montré que de nombreux pics peptidiques pouvaient être détectés dans les 2 cas, mais avec une intensité de signal beaucoup plus faible pour l'échantillon à 5 g/L de T3, ce qui suggère qu'il contenait une proportion importante de peptides liés à des polyphénols et qui n'ont pas été quantifiés. Par conséquent, cette analyse n'a produit que des résultats qualitatifs, avec près de 700 et 800 protéines identifiées dans les 2 conditions (Figure 70). Une dizaine de protéines n'ont été détectées que dans la modalité avec ajout de 5 g/L d'extrait T1 (Tableau 14). Néanmoins, en l'absence de quantification, ces résultats ne peuvent pas être validés par des analyses statistiques. Pour la suite des travaux, un protocole d'extraction et de purification des protéines a été mis au point et validé spécifiquement pour ce type d'échantillons (Section « Matériels et méthodes »). Il permet d'obtenir des fractions peptidiques dépourvues de polyphénols

contaminants à partir de cellules d'*O. oeni* cultivées dans un milieu riche en composés phénoliques.

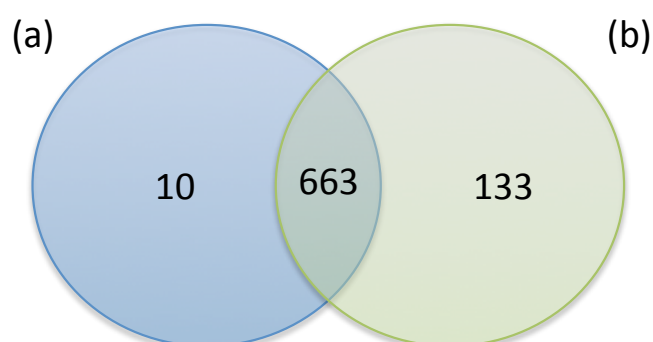


Figure 70 : Répartition des protéines identifiées chez la souche 14215 en présence de 0 ou 5 g/L d'extrait T1.

Le diagramme de Venn représente les nombres de protéines identifiées par LC-MS/MS chez la souche CRBO 14215 inoculée pendant 48h dans un vin blanc en présence de 5 g/L d'extrait T1 (a) ou sans ajout (b).

Tableau 14 : Liste des protéines identifiées chez la souche 14215 en présence de 5 g/L d'extrait T1.

N° accession	Description
D3L948	Uncharacterized protein
D3LA93	Diadenosine tetraphosphate hydrolase
D3L8W0	Uncharacterized protein
A0NI59	Uncharacterized protein
Q04G87	Uncharacterized protein
D3LA55	Exodeoxyribonuclease VII small subunit
D3L916	Uncharacterized protein
D3LA49	Guanylate kinase
D3L8Y2	Oligopeptide transport system permease protein OppB
Q04GX8	DNA repair protein RadA

IV.2. Analyse du protéome de la souche LAB6 en présence de polyphénols

IV.2.1. Production des protéomes de LAB6 avec ou sans ajout d'extrait T3

D'après les résultats des tests phénotypiques présentés en début de chapitre, la souche LAB6 a été choisie pour rechercher les mécanismes de résistance qu'elle met en jeu lors de l'exposition aux polyphénols. Elle a été utilisée sous forme « production liquide » pour pouvoir identifier les caractéristiques permettant à cette souche de mieux résister que les autres. En effet, dans nos conditions de test, la production lyophilisée semble uniformiser le comportement de toutes les

souches et ne permettrait donc pas d'identifier les mécanismes de résistance aux polyphénols spécifiques de la souche LAB6. Les conditions de tests qui ont été retenues sont une exposition dans un vin rouge et en présence de 0, 1 ou 2,5 g/L d'extrait T3, car la souche LAB6 résiste bien à ces conditions. En présence de 5 g/L d'extrait, elle est très clairement en phase de déclin, ce qui ne permettrait pas de mettre en évidence des protéines de résistance au stress. La bactérie a donc été inoculée dans ces 3 conditions et, après une semaine d'incubation, les cellules ont été récoltées et congelées. Tous les essais ont été réalisés en triplicatas.

Les protéines de chaque essai ont été extraites et purifiées par chromatographie sur une colonne chargée de PVPP afin d'éliminer les polyphénols. Elles ont ensuite été concentrées par précipitation et purifiées sur gel d'électrophorèse. Des peptides ont été produits par digestion à la trypsine et ils ont été analysés par nanoLC-MS/MS pour réaliser l'analyse de protéomique quantitative par la méthode « Label free ».

Environ 1000 protéines ont été identifiées lors de chaque analyse (Figure 71). Au total, 1211 protéines ont été identifiées et 1115 ont pu être quantifiées avec au moins trois valeurs d'intensité pour les 3 réplicats d'une condition. Le génome de la souche LAB6 contient 2102 séquences codantes. Ce sont donc plus de 53 % des protéines prédites dans le génome qui ont été quantifiées.

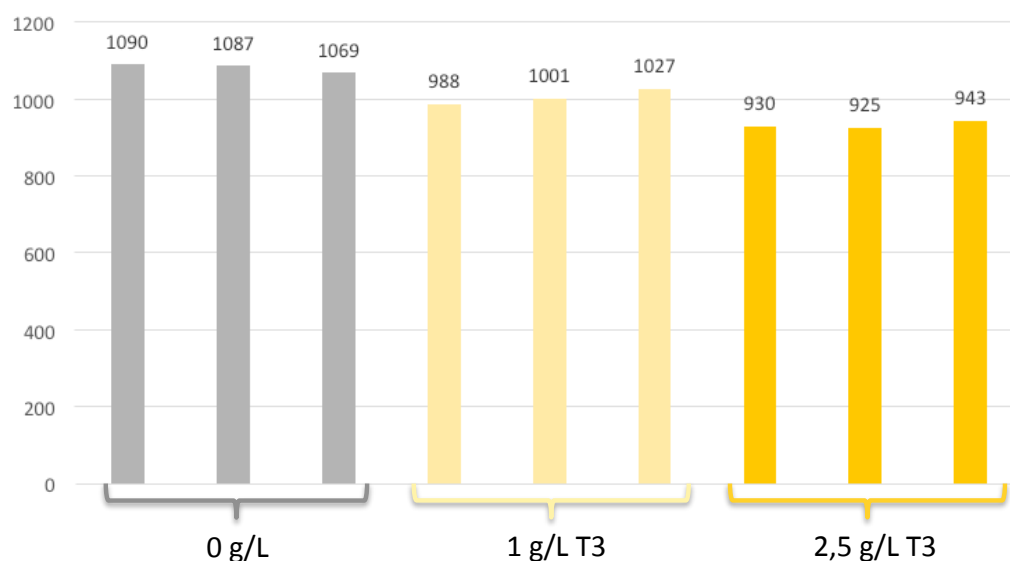


Figure 71 : Nombres de protéines identifiées par protéomique quantitative après incubation de la souche LAB6 dans un vin rouge en présence ou absence d'extrait T3.

La souche LAB6 a été exposée pendant 7 jours dans un vin rouge supplémenté ou non en extrait T3, puis ses protéines ont été extraites, purifiées et digérées, et les peptides obtenus ont été analysés par protéomique quantitative par la méthode Label free. Chaque histogramme représente le nombre de protéines uniques identifiées pour un des 3 réplicats de chaque condition.

Les niveaux d'expression des protéines ont été comparés entre la modalité contrôle sans ajout de polyphénols et les modalités avec ajout de 1 g/L ou 2,5 g/L d'extrait T3. La Figure 72 présente les pourcentages de protéines sur- ou sous-exprimées d'après ces comparaisons. Dans les deux conditions, il y a près de deux fois plus de protéines sous-exprimées que sur-exprimées. De plus, l'augmentation de la concentration en extrait T3 accroît considérablement les pourcentages de protéines dont l'expression est affectée dans un sens ou dans l'autre.

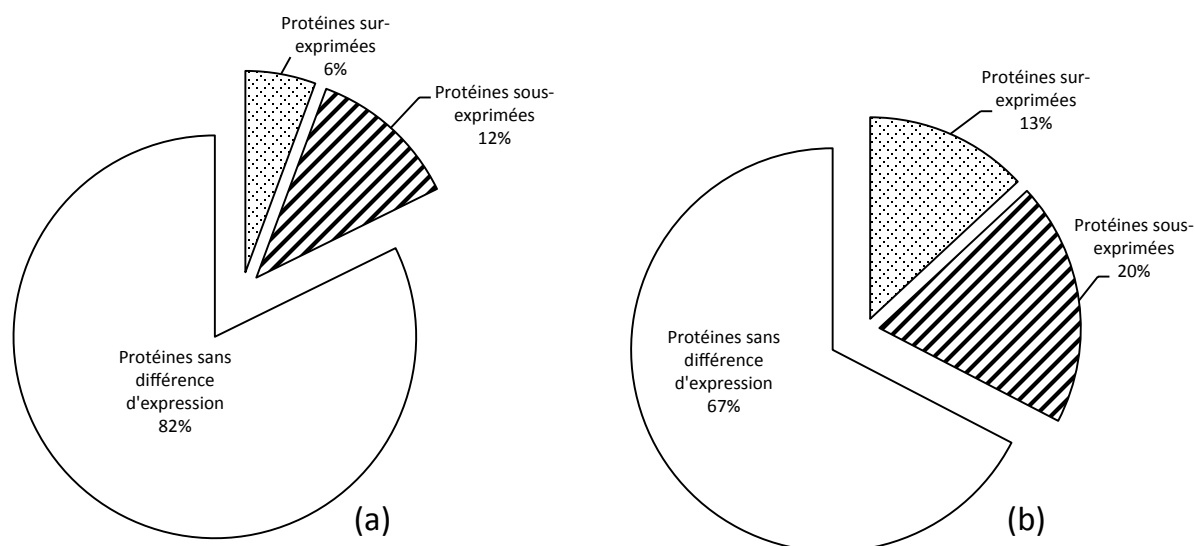


Figure 72 : Modification de l'expression des protéines de la souche LAB6 en présence d'extrait T3.

Les pourcentages de protéines dont les niveaux d'expression ont été modifiés entre la modalité sans ajout de polyphénols et les modalités avec ajout de 1 g/L (a) ou 2,5 g/L (b) d'extrait T3 ont été déterminés par analyse protéomique Label free. Les ratios des niveaux d'expression de chaque protéine dans les deux conditions comparées ont été calculés et leur significativité a été évaluée par un test de student. Les protéines sont considérées comme étant sous-exprimées pour un ratio < 0,8 ($p\text{-value} \leq 0,05$) et sur-exprimées pour un ratio > 1,2 ($p\text{-value} \leq 0,05$).

IV.2.2. Analyse des voies métaboliques de LAB6 affectées par la présence d'extrait T3

Les voies métaboliques et les fonctions cellulaires affectées par la présence d'extrait T3 ont été identifiées en localisant les protéines dans les voies de la base de données KEGG. Les Figure 73 et 73 montrent les nombres de protéines sur-exprimées, sous-exprimées ou d'expression non modifiée, dans chaque voie métabolique, lors de l'ajout de 1 ou 2,5 g/L d'extrait T3, respectivement. Certaines protéines n'ont pas pu être positionnées dans ces voies, car elles ne sont pas présentes chez la souche PSU-1, qui est la souche d'*O. oeni* de référence utilisée par KEGG. Ces protéines spécifiques de LAB6 sont listées dans l'Annexe 5.

D'après les Figures 71 et 73, l'ajout d'extrait T3 induit la sous-expression de protéines dans un grand nombre de voies métaboliques. Lorsqu'on sélectionne uniquement les protéines dont l'analyse de la variation est significative avec une $p\text{-value} < 0,05$, le nombre de protéines affectées à chaque voie diminue, mais la proportion de protéines sous-exprimées est encore plus importante. Les voies métaboliques et fonctions cellulaires affectées le plus fortement ont été identifiées par un test d'enrichissement et sont présentées dans les Figure 74 et Figure 76.

Il est remarquable que la plupart des voies métaboliques impliquées dans la maintenance cellulaire soient fortement inhibées. En effet, que ce soit en présence de 1 ou de 2,5 g/l d'extrait T3, il y a une sous expression de nombreuses protéines impliquées dans la réplication ou la réparation de l'ADN, dans la synthèse protéique (protéines ribosomiques et amino acyl-tRNA synthétases), dans la biosynthèse de la paroi et des acides gras membranaires, dans le métabolisme du pyruvate, des acides aminés, des purines et pyrimidines ou dans les échanges cellulaires réalisés par des transporteurs membranaires (types ABC ou PTS). Cette inhibition « généralisée » de l'activité cellulaire est à rapprocher des taux de survie de la souche LAB6 qui avaient dans un premier temps été mesurés dans ces conditions lors de l'étude phénotypique. En effet, en présence de 1 ou 2,5 g/L d'extrait T3, la souche LAB6 était celle qui avait le mieux résisté. Néanmoins, après une semaine d'incubation, la population de cellules vivantes dans cette étude protéomique est réduite à un niveau de l'ordre de 50 % de la population initiale dans la condition à 2,5 g/L de T3 et de 85 % dans la condition avec 1 g/L de T3. On peut donc penser que les protéines de cellules mortes ou incapables de former des colonies ont été extraites et quantifiées. Par conséquent, cette forte proportion de protéines sous-exprimées dans les fonctions de maintenance et division cellulaire est probablement due au fait que la plupart des cellules étaient dans un physiologique ne leur permettant pas de se multiplier.

Il est également évident que ces cellules, ou au moins une certaine proportion d'entre elles ont maintenu une activité métabolique significative. En effet, à côté des protéines sous-exprimées, d'autres protéines ont été sur-exprimées en présence de 1 ou de 2,5 g/l d'extrait T3 ou bien dans les deux conditions. Il s'agit en particulier de protéines du métabolisme énergétique, avec la sur-expression de plusieurs sous-unités de l'ATP synthétase et de diverses enzymes du métabolisme des sucres : aldose 1 épimérase, la galactokinase, la β -phosphoglucomutase, la glucose-6-phosphate isomérase, la Fba, la phosphoglycerate mutase, l'énolase et l'alcool deshydrogénase et des transporteurs de type PTS, spécifiques du cellobiose (CelC et CelA) et du mannose (ManZ). Quelques protéines pouvant contribuer directement ou indirectement à la résistance au stress sont également sur-exprimées dans les deux conditions. Ce sont des protéines du métabolisme du glutathion (GshR, la glutathion S-transferase et la phosphogluconate déshydrogénase), du

citrate (CitC, CitD et CitE, acétoïne réductase), ainsi que des protéines chaperones et des protéines « UspA » de réponse au stress.

Enfin dans l'Annexe 6, on remarque la présence d'un grand nombre de protéine d'origine phagique et plasmidique avec ou sans changement d'expression. Il y a par exemple des protéines provenant de plasmide qui sont sur-exprimées comme LtrC, le module toxine antitoxine RelB/DinJ, le régulateur de transcription TetR, une transposase, la flavine oxydoréductase NADH dépendante ou Old yellow enzyme (Oye) ainsi que d'autres protéines plasmidique sans changement d'expression (une résolvase Res, une protéine de réplication RepA, des protéines de partition ParA et parB, le régulateur de transcription LysR) et potentiellement d'autres protéines non caractérisées. Ces protéines plasmidiques sont également retrouvées dans la modalité avec 1 g/L d'extrait T3 ajouté, mais les ratios obtenus ne sont pas significatifs.

Toujours au niveau de l'Annexe 6 des protéines non mappées sur PSU1, on remarque la présence de protéines appartenant à deux phages : de la protéine D3LC52 à D3LC96 ainsi que la protéine D3LCT0 (Holin) appartiennent à un phage de type A tandis que les protéines de D3LCF0 à D3LCR0 appartiennent à un phage de type D hormis les protéines plasmidique (D3LCG3 et D3LCQ4). De nombreuses protéines de phage A sont sur-exprimées : deux protéines appartenant à la queue du phage, une protéine capsidique, une terminase petite et grande sous unités, une hélicase, une intégrase, et des protéines non caractérisées.

Au niveau des protéines du phage D, une protéine de réplication et d'initiation est réprimée tandis que des protéines de liaison avec l'ADN et des protéines non caractérisées sont sur-exprimées. De plus, un transporteur ABC présent au niveau des modules de conversion lysogénie des phages est sur-exprimé seulement dans la condition à 2,5 g/L de T3 ajoutés.

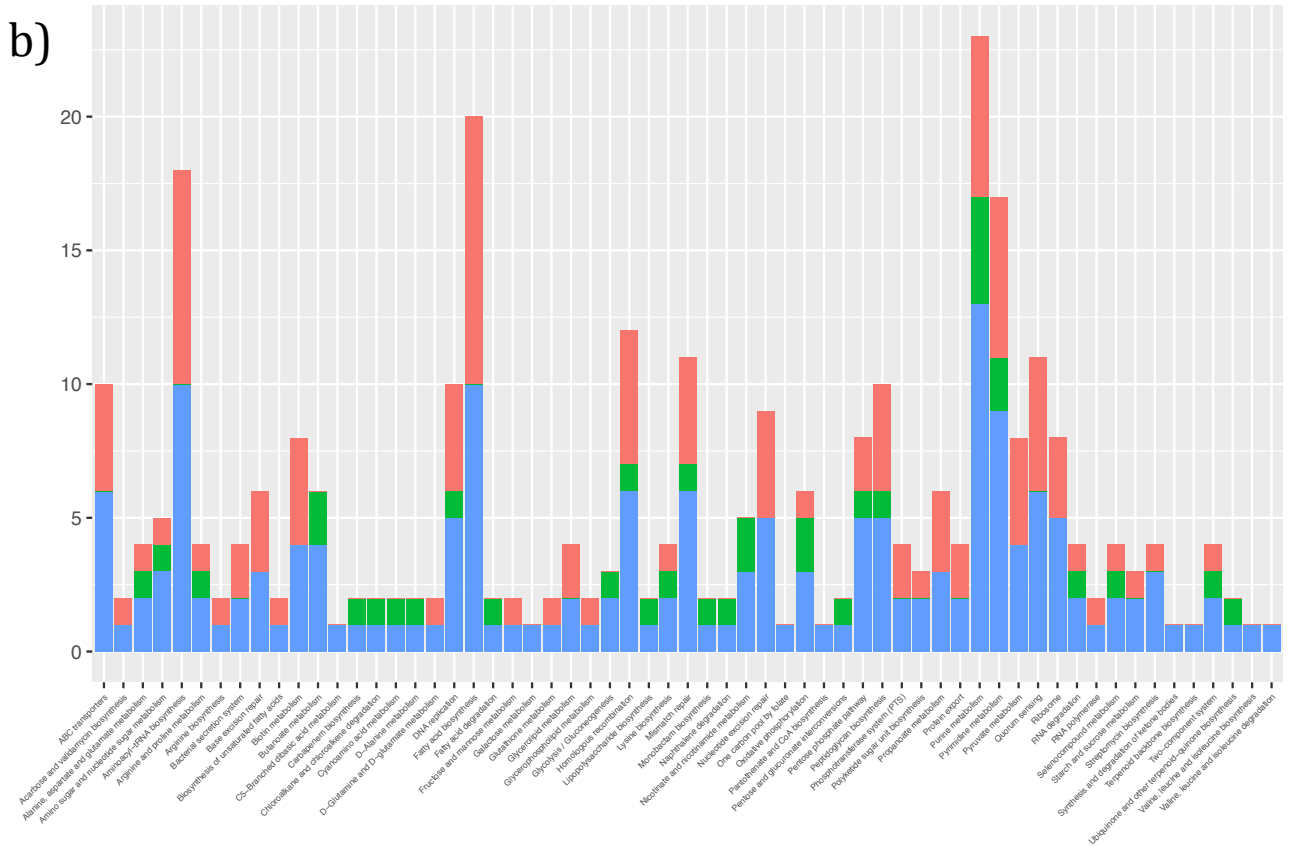
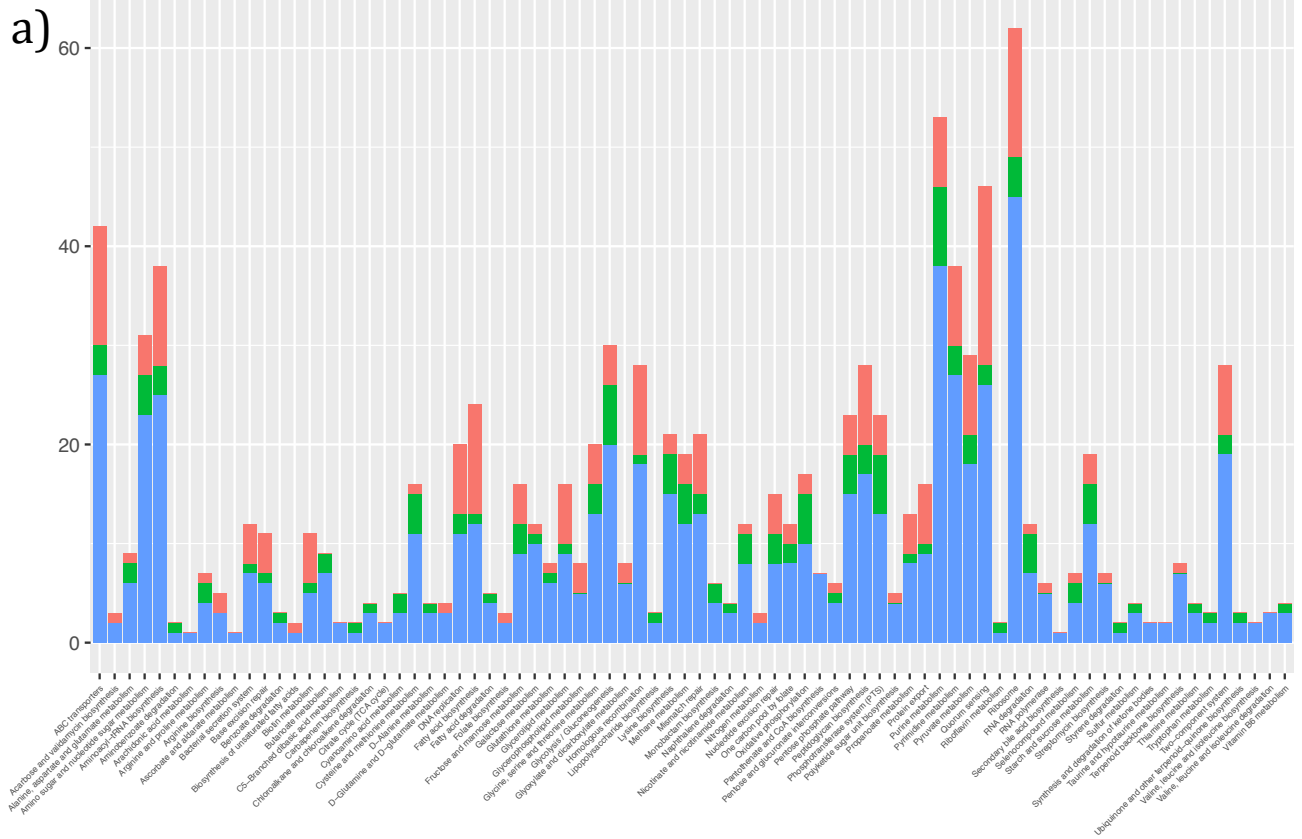


Figure 73 : Distribution des protéines de la souche LAB6 sur- ou sous-exprimées lors de l'ajout de 1 g/L d'extrait T3.

Les protéines de la souche LAB6 quantifiées par la méthode label free lors de l'exposition dans un vin en présence de 0 ou 1 g/L d'extrait T3 ont été affectées dans les voies métaboliques de la base de données KEGG en utilisant les protéines de la souche PSU-1 comme référence. Le graphique (a) représente l'ensemble des protéines identifiées et le graphique (b) représente les protéines dont l'expression est modifiée de manière significative ($p\text{-value} \leq 0,05$). Les couleurs des histogrammes représentent les niveaux d'expression : protéines sur-exprimées avec un ratio supérieur à 1,2 (en vert), sous-exprimées avec un ratio inférieur à 0,8 (en rouge), et sans changement d'expression (en bleu). La hauteur des histogrammes représente le nombre de protéines dans chaque voie métabolique.

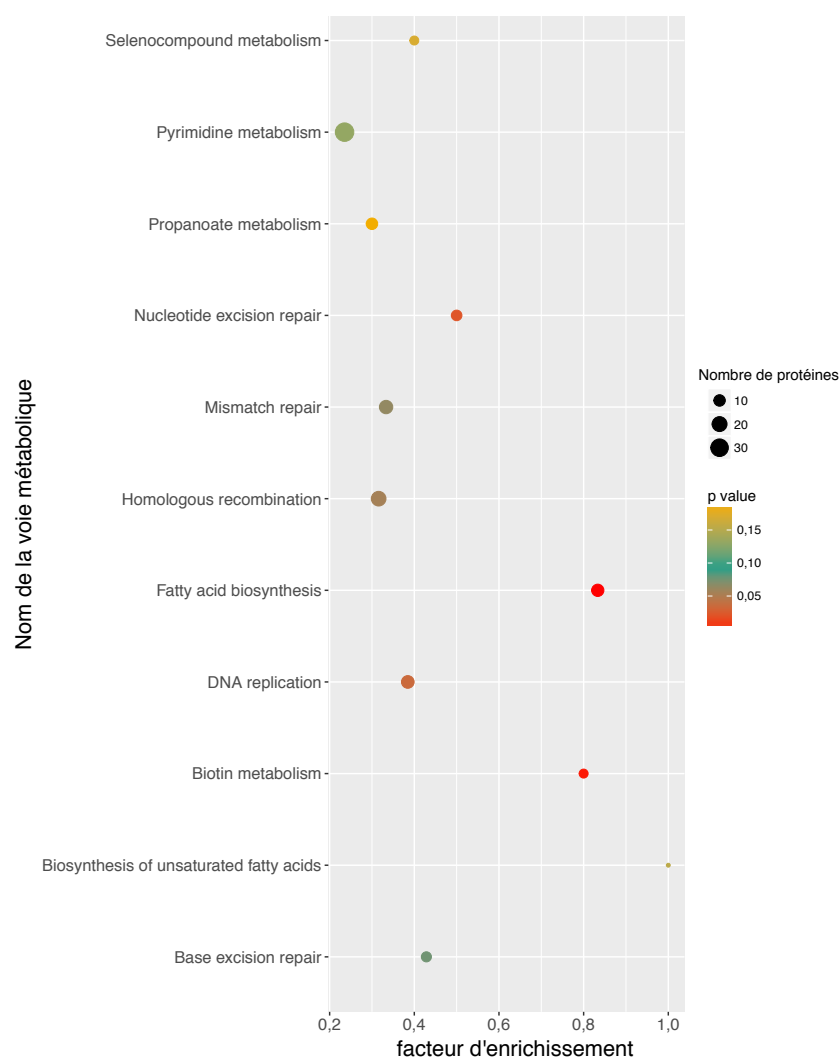


Figure 74 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress en présence de 1 g/L d'extrait T3.

Le facteur d'enrichissement correspond au ratio du nombre de protéines ayant un changement d'expression sur le nombre total de protéines dans la voie métabolique étudiée. Les protéines ayant un ratio inférieur ou égal à 0,8 ou supérieur ou égal à 1,2 avec un $p\text{-value} \leq 0,05$ ont été sélectionnées pour le test d'enrichissement effectué sur le logiciel R. Une p-value affectée à l'ensemble de la voie est ainsi calculée.

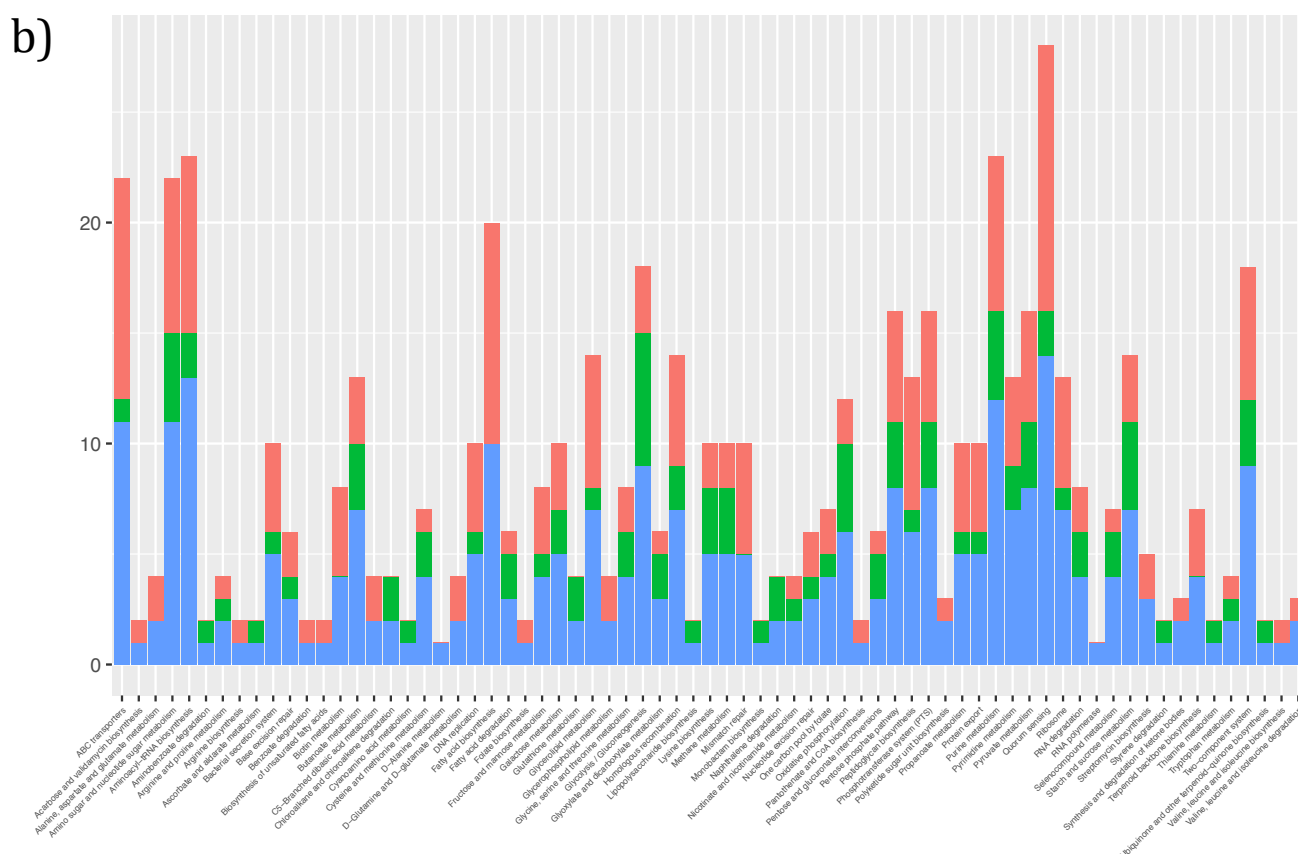
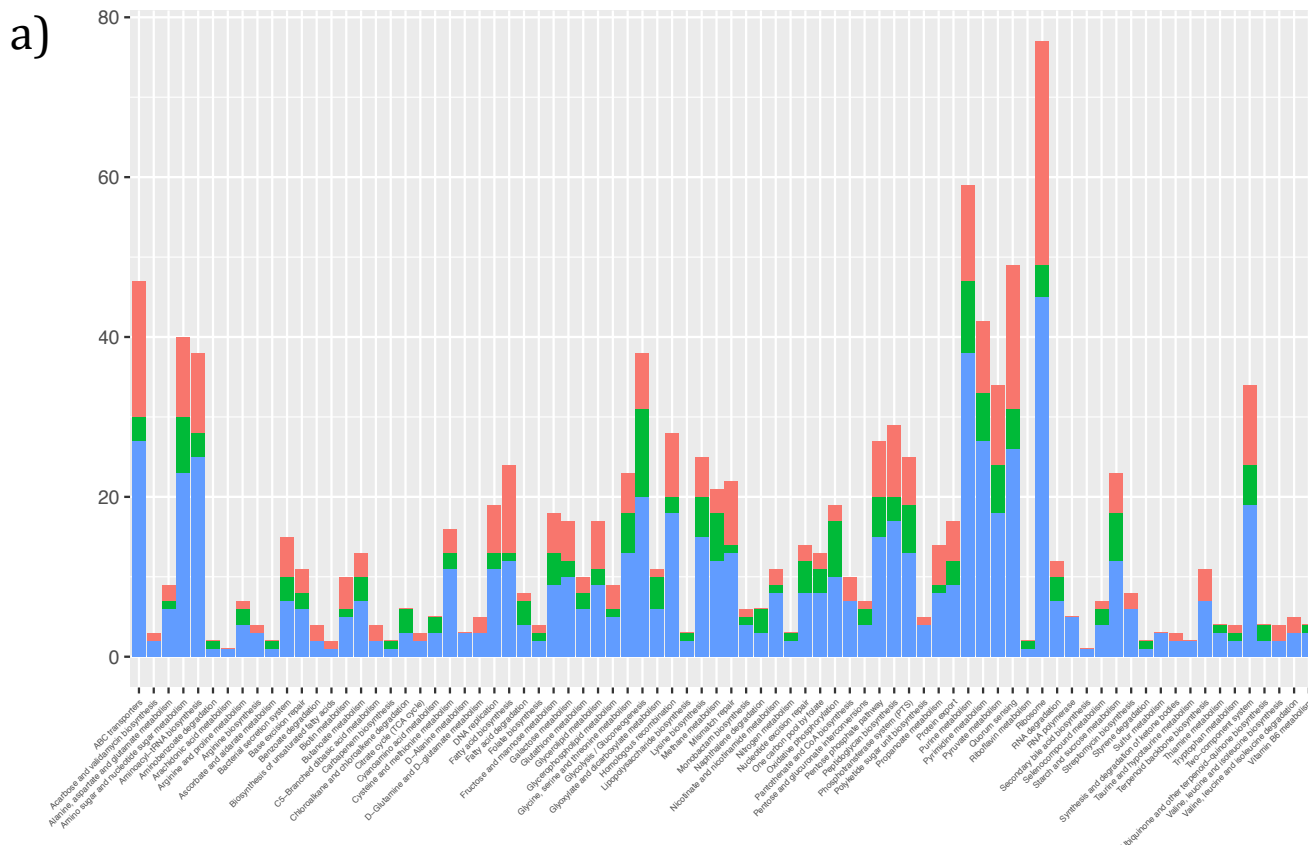


Figure 75 : Distribution des protéines de la souche LAB6 sur- ou sous-exprimées lors de l'ajout de 2,5 g/L d'extrait T3.

Les protéines de la souche LAB6 quantifiées par la méthode label free lors de l'exposition dans un vin en présence de 0 ou 2,5 g/L d'extrait T3 ont été affectées dans les voies métaboliques de la base de données KEGG comme indiqué dans la Figure 73.

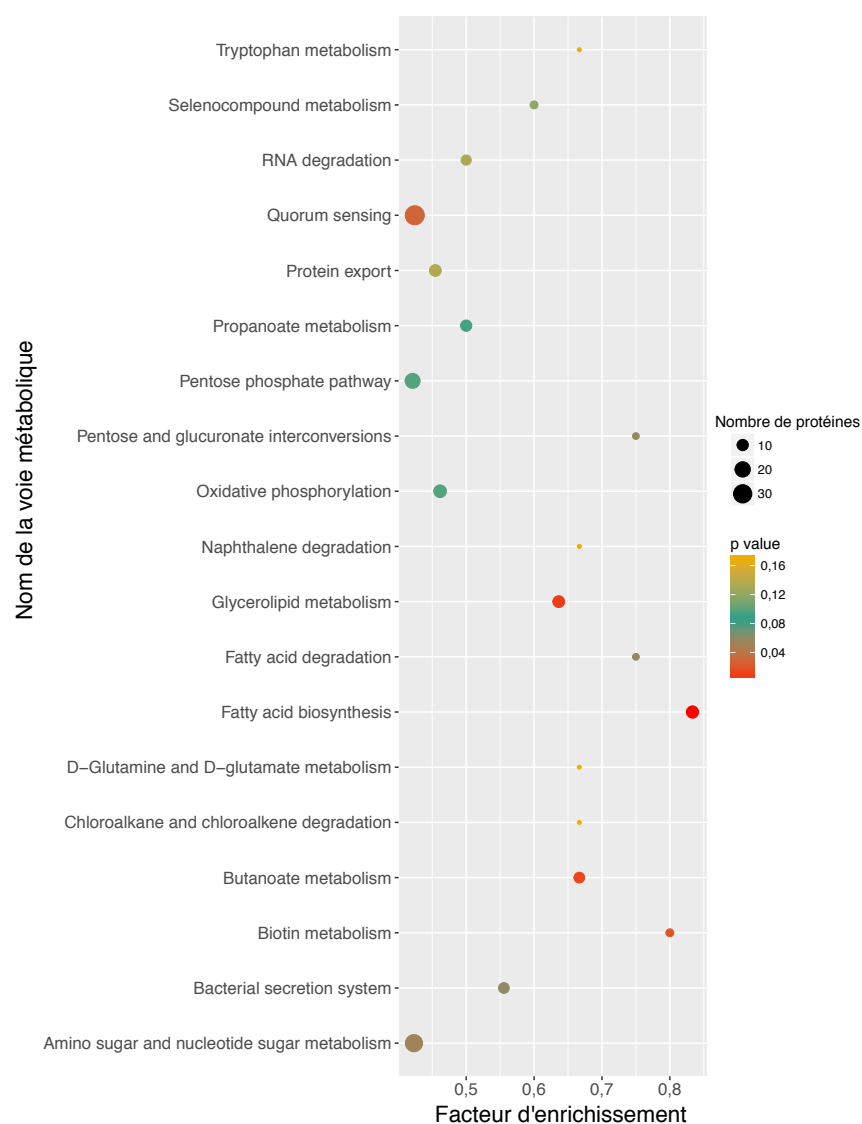


Figure 76 : Enrichissement des voies métaboliques pour les protéines ayant un changement d'expression lors d'un stress en présence de 2,5 g/L d'extrait T3.

Le facteur d'enrichissement correspond au ratio du nombre de protéines ayant un changement d'expression sur le nombre total de protéines dans la voie métabolique étudiée. Les protéines ayant un ratio inférieur ou égal à 0,8 ou supérieur ou égal à 1,2 avec une p-value $\leq 0,05$ ont été sélectionnées pour le test d'enrichissement effectué sur le logiciel R. Une p-value affectée à l'ensemble de la voie est ainsi calculée.

V. Discussion

Le but principal de cette étude était d'étudier les mécanismes de résistance aux polyphénols chez des souches commerciales ayant été sélectionnées par la société Lallemend pour leur capacité d'adaptation au vin. Nous avons dans un premier temps souhaité étudier les possibles différences phénotypiques entre deux modes de préparation des souches (lyophilisée ou en culture) vis-à-vis des polyphénols rencontrés dans le vin, mais également provenant d'extrait. En effet, les levains malolactiques sont sélectionnés selon des paramètres précis comme leurs capacités fermentaires, la production d'arôme, mais également selon leur résistance au processus de fabrication (application de divers stress et lyophilisation). De nombreux auteurs ont en effet observé une amélioration de la survie des levains lors de préacclimatation (culture acide, chauffage, éthanol...) ou lors de l'utilisation de cryoprotectant (Bravo-Ferrada et al., 2015) (Zhao & Zhang, 2009a). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux différences phénotypiques dans le vin entre les deux modes de préparation des souches d'*O. oeni*.

Dans les différents tests phénotypiques effectués, on remarque une très bonne standardisation des souches commerciales lors du passage sous forme de levains même pour des souches d'origines diverses. De plus, les levains lyophilisés résistent mieux à l'ajout d'extrait polyphénolique T3. Ces phénotypes de survie en condition de stress ont été associés pour la souche LAB6 à une morphologie cellulaire bien particulière observée par MET avec la présence de polysaccharides notamment présents lors de l'inoculation de la souche en version lyophilisée dans le vin rouge. Chez *Bifidobacterium bifidum*, la préparation à la lyophilisation par l'action de haute température sub létale augmente la production d'EPS et donc leur survie à la lyophilisation (Nguyen et al., 2014). Néanmoins, à l'heure actuelle, les conditions de l'induction de la production d'EPS par les souches d'*O. oeni* ne sont pas à ce jour assez connues. La présence d'EPS ou de capsule semble cependant varier en fonction du stade de croissance de la bactérie (Coulon et al., 2012), mais également lorsqu'on compare les conditions utilisées dans diverses études en fonction des conditions de culture (type de milieu, concentrations en sucres, présence de stress, état de la cellule). En effet, on peut se demander quelles sont les meilleures conditions d'observation et de quantification d'EPS ou CPS. Dimopoulou et al. (2014) ont dans leur étude, observé différents phénotypes d'EPS dans des milieux de croissance ne contenant aucun stress. Tandis que lors d'une autre étude, la formation d'un biofilm par *O. oeni* en présence de stress active certains gènes participant à la production d'EPS (Bastard et al., 2016).

En ce qui concerne les mécanismes d'adaptation et de résistance aux stress peuvent eux être étudiés de manière globale avec l'utilisation de technique haut débit intégrant ainsi un grand nombre de variables. Les techniques dites 'omics comme la transcriptomique, la protéomique et

la métabolomique sont utilisées séparément ou associées afin de définir des variations phénotypiques au niveau moléculaire et ainsi identifier des marqueurs génétiques. Néanmoins, dans notre cas, l'utilisation de la méthode de séquençage des ARN totaux n'a pas pu être effectuée. L'amélioration depuis quelques années de la qualité des extractions des ARN d'*O. oeni* ouvre la voie à la réalisation d'étude transcriptomique plus complexe (Liu et al., 2017) (Sternes et al., 2017). Cependant, dans notre cas, le cahier des charges pour le RNAseq est à l'heure actuelle impossible à remplir avec des ARN dont on ne connaît pas encore la demi-vie et ayant été en contact prolonger avec des polyphénols. Nous avons donc au cours de cette thèse changée de direction avec la réalisation d'une étude protéomique dans le but de comprendre l'action des polyphénols sur les mécanismes de résistance d'*O. oeni* dans le vin. Diverses études se sont penchées sur les mécanismes de réponse aux stress via l'analyse du protéome que se soit sur *O. oeni* ou sur d'autres espèces. Les études sont depuis quelques années passées de technique en deux dimensions (2D) (Da Silveira & Abee, 2009) (Cecconi et al., 2009) (Olguín et al., 2009) (Koponen et al., 2012) (Costantini et al., 2015) à des techniques sans gel avec marquage isotopique (iTRAQ) (Margalef-Català et al., 2016a). Les techniques en 2D présentent certes des inconvénients comme la grande variabilité des expérimentations entre les gels, mais ont néanmoins permis d'apporter des renseignements sur les mécanismes de résistance aux stress. Dans les études protéomiques effectuées dans cette partie, nous avons utilisé deux souches, la souche de Bourgogne 14215 pour une l'étude préliminaire et la souche commerciale LAB6 pour l'étude de l'effet de l'extrait polyphénolique T3. Les deux souches testées sont très différentes du point de vue phénotypique et génomique, cependant les résultats de l'étude préliminaire étant seulement qualitatif, seuls les résultats de l'effet des polyphénols sur la souche LAB6 seront pris en compte pour la discussion. La sélection de la souche LAB6 (version liquide) pour cette étude protéomique est du au fait que cette souche présentait des caractéristiques intrasèques importantes de résistance à l'extrait T3 indépendantes à la préparation sous forme de levains.

La première étape pour la réalisation de l'étude protéomique a donc été de tester l'effet des polyphénols sur l'extrahibilité des protéines et leur quantification. On a ainsi pu remarquer que le protocole classique d'extraction n'était pas en adéquation avec nos conditions (matrice vin, présence de polyphénols à de fortes concentrations). Avec l'aide de l'université de Laval, nous avons testé différents protocoles pour enfin en trouver un permettant de nettoyer l'échantillon sans toutefois perdre un trop grand nombre de protéines (cartouche chargée en PVPP).

De manière générale, on remarque dans cette étude protéomique une forte répression au niveau des protéines de voies métaboliques principales traduisant un stress important et le passage en mode survie des cellules. Pourtant, de nombreuses protéines ont des ratios d'expression élevés

entre les modalités avec et sans ajout d'extrait T3. Il y a donc la mise en place de mécanismes parallèles afin de se maintenir et résister au stress.

Transport et métabolisme des carbohydrates

L'ajout de 1 g/L d'extrait T3 n'entraîne pas ou peu de changement important dans l'expression des protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des carbohydrates (PTS mannose réprimée). Néanmoins, lorsqu'on augmente la concentration en extrait T3, on observe des modifications d'expression avec une activation de l'entrée de cellobiose dans la cellule via le système PTS tandis que les PTS mannose, galatitol et beta glucosides sont réprimés. La capacité d'*O. oeni* en ce qui concerne l'utilisation des sucres a été précédemment établie comme étant souches-dépendante (Cibrario et al., 2016), et présentant de nombreuses variations en ce qui concerne leurs phosphotransférases (Borneman et al., 2012) (Sternes & Borneman, 2016). Néanmoins, une étude récente a montré que certains PTS (cellobiose et galactitol) bien que très conservés dans les génomes pouvaient présenter des différences d'expression entre les souches (Sternes et al., 2017).

Glycolyse et voie des pentoses phosphate

Au niveau de la voie des pentoses phosphate, on remarque que l'utilisation de l'arabinose pour sa conversion en L-ribulose est réprimée, ainsi que l'entrée du gluconate via sa perméase. De plus, il y a une inhibition de la phosphoketolase permettant de passer du Xylulose-5-P à la glycéraldéhyde-3-P indiquant probablement la formation privilégiée de cette molécule via une autre voie. Comme dans l'étude précédente sur l'effet de l'acidité, on remarque une activation progressive entre 1 et 2,5 g/L de la voie de Embden Meyerhof avec comme enzyme centrale la Fba qui est sur-exprimée dans les deux conditions. La souche LAB6 possède une PTS fructose spécifique dans son génome, mais qui n'est pas sur-exprimée dans cette étude. L'absence de la 6-phosphofructokinase chez cette souche induit donc principalement une réalisation de la voie seulement par l'entrée du fructose via une PTS spécifique afin d'obtenir du fructose-1-P et être ensuite transformé en fructose-1,6 bis-P par la 1phosphofructokinase (présente dans le génome de la souche). Puis le reste de la voie est réalisé et privilégié vers la formation du pyruvate (Fba, phosphoglycérate kinase, phosphoglycérate mutase, enolase sont sur-exprimées). À l'heure actuelle, le métabolisme du fructose n'est pas totalement élucidé notamment sur la corrélation entre le phénotype et génotype des souches (Cibrario et al., 2016). Dans cette même étude, la souche LAB6 n'est pas capable de croître sur un milieu spécifique au fructose et présente une PTS fructose spécifique tronquée ou présentant des pseudogènes. Dans notre étude, la sur-expression de la voie de Embden Meyerhof dans les conditions de stress laisse néanmoins penser la probable entrée du fructose sous forme fructose-1-P.

Les polyphénols comme l'acidité (Chapitre 2) déclenchent l'activation de cette voie, mais nécessitant l'entrée du fructose par une PTS spécifique et l'action de la Fba. Ce changement de métabolisme pourrait être due à la nécessité pour la souche de se maintenir dans le milieu notamment en présence de stress et permettant ainsi d'augmenter l'apport en énergie (ATP) à la cellule pour d'autres processus métaboliques.

Métabolisme du citrate et du malate

Au niveau du métabolisme du citrate et du malate, on remarque que dans les deux conditions avec ajout de polyphénols une ou plusieurs enzymes de l'opéron citrate sont sur-exprimées (CitC à 1 g/L et CitCDF à 2,5 g/L). Néanmoins, on n'observe dans aucune des deux conditions une modification de l'expression de l'enzyme malolactique. On sait que l'entrée du citrate dans la cellule permet la création d'un gradient de pH et de potentiel électrique transmembranaire (Ramos et al., 1994) similaire à ceux engendrés par la FML. Or, l'activation de l'opéron citrate semble être impliquée dans d'autres mécanismes d'adaptation et de résistance au vin (pH bas et présence d'éthanol) (Olguín et al., 2009), mais en fonction des conditions, de la souche ou du moment de l'analyse, l'expression de cet opéron peut varier (Olguín et al., 2015) (Costantini et al., 2015).

Enfin, dans notre étude on remarque la sur-expression de l'acétoïne réductase et de la diacétyl réductase montrant ainsi la transformation du diacétyl dans un premier temps en acétoïne puis en 2,3-butanediol. Ces réactions permettent l'oxydation de molécule de NAD(P)H participant ainsi au maintien de la balance redox des cofacteurs. Ces données de protéomique sont corrélées avec celles de (Margalef-Català et al., 2016a) chez *O. oeni* dans un milieu modèle de vin, qui serait associé à la dégradation de l'acide citrique.

Cependant dans notre cas, la production du produit final le 2,3-butanediol ne semblerait pas provenir majoritairement de la consommation du citrate, car les enzymes nécessaires à cette voie (acétolactate décarboxylase et l'acétolactate synthase) sont sous-exprimées. La synthèse du diacétyl passerait donc par l'autre voie disponible via l'acétyl-coA.

Métabolisme des lipides, biosynthèse de la membrane et de la paroi

Dans les deux conditions testées, l'ensemble des enzymes nécessaires à la biosynthèse des acides gras est sous-exprimé (ACC, FabDHFGZK). De plus on remarque que le métabolisme des glycérolipides (vers une inhibition des précurseurs aux acides lipoteichoïques) ainsi que la biosynthèse du peptidoglycane sont également réprimés.

On peut donc penser qu'une très forte inactivation de la biosynthèse de la membrane et des constituants du peptidoglycane intervient lors de l'ajout de polyphénols. Les polyphénols

ajoutés ont ici un effet répressif sur ces voies ce qui peut traduire par un fort déclin de la division cellulaire en faveur d'un mode de survie de la cellule.

Réponses aux stress

Lors de l'augmentation de la concentration en polyphénols ajoutés (2,5 g/L) on remarque l'activation de l'ATP synthase et de certaines protéines impliquées dans le métabolisme du glutathion. On observe par exemple la sur-expression de la glutathione réductase permettant la réduction de la glutathion bisulfide en deux molécules de glutathion. De plus, la glutathion S-transférase qui permet l'élimination de substances xénobiotiques est également sur-exprimé. Ces niveaux d'expression font donc penser que les cellules doivent faire face à des DRO et à leur élimination. Ces mécanismes ont été précédemment identifiés dans des études sur l'impact de l'éthanol ou du pH chez *O. oeni* (Silveira et al., 2004) (Cecconi et al., 2009) (Costantini et al., 2015) (Margalef-Català et al., 2017), mais n'a cependant jamais été identifié lors d'un stress polyphénolique.

D'un autre côté, l'ajout de 2,5 g/L entraîne la répression du transporteur ABC au phosphate (PstS, PstB et PstC). Or, des mutants de *L. lactis* résistant au stress acide présentent une capacité à résister au stress oxydatif importante et un gène codant pour le transporteur ABC du phosphate non fonctionnel (*pstS*) (Rallu et al., 2000). Les auteurs ont ainsi évoqué le rôle supposé d'une diminution du phosphate intracellulaire comme un signal interne au stress. Des mécanismes généraux de résistance peuvent donc également conférer une résistance au stress oxydatif.

Réplication ADN, dégradation d'ARN et systèmes de réparation

La concentration en polyphénols (2,5 g/L) a un impact assez important sur la répression de la réplication de l'ADN renvoyant ainsi vers d'autres mécanismes impliqués vers la survie cellulaire contrairement à ceux normalement observés chez des cellules en croissance. La dégradation de l'ARN elle, semble plus hétérogène avec l'activation ou l'inhibition d'hélicase, d'RNase et d'énolase. Enfin, au niveau des systèmes de réparation il y a une très forte inhibition de divers systèmes présents chez la souche LAB6.

Plasmides et phages

La souche LAB6 présente des éléments génétiques mobiles à savoir deux prophages (classés dans les groupes A et D) ainsi qu'un plasmide. En présence de polyphénols et notamment à la concentration la plus élevée, on remarque la sur-expression de protéines associées au phage A. Il s'agit de protéines impliquées dans la morphogénèse de la tête et la queue, son excision, sa réplication, l'empaquetage de son ADN ou encore la lyse sont présentes et/ou sur-exprimées. Ce

phénomène suggère l'induction (excision) du prophage A et son retour vers un cycle lytique. À contrario, nous n'observons aucun signal suggérant l'excision du prophage D. On observe même la répression de la protéine de l'initiation de la réplication. Ces résultats semblent en accord avec les différences de stabilité observées chez les phages A, B et D et notamment la stabilité accrue des prophages du groupe D (Jaomanjaka et al., 2013). On peut suggérer que le prophage est utile à la gestion du stress via des fonctions particulières portées sur son génome. Ces fonctions particulières nommées morons sont localisées à l'extrémité droite du génome.

On remarque que chez le phage D, l'un de ces gènes codant pour un transporteur ABC est sur-exprimée. Cette zone peut-être non essentielle pour le métabolisme du phage pourrait présenter un certain intérêt pour la souche. En présence de polyphénols de l'extrait T3, il y a donc eu une induction du phage A tandis que le phage D est resté globalement dans les cellules et certains de ses gènes ont été exprimés pouvant ainsi participer aux phénomènes de résistance.

Enfin, le plasmide présent chez LAB6 montre une sur-expression de certaines de ces protéines comme la protéine LtrC, le module toxine antitoxine RelB/DinJ, le régulateur de transcription TetR, une transposase, ou encore la protéine Oye. Cette dernière pourrait être impliquée dans la résistance aux stress chez *O. oeni* selon (Favier et al., 2012). Il en est de même pour une protéine homologue chez *Bacillus subtilis* qui est sur-exprimée lors de la réponse aux stress oxydatifs ou à l'acidification du cytosol (van den Hemel et al., 2006)

Conclusion générale

Oenococcus oeni est l'espèce privilégiée pour la fermentation malolactique dans le vin en raison de ses capacités fermentaires et son excellente adaptation au vin. Depuis quelques années les études sur la diversité de l'espèce *Oenococcus oeni* ont montré des adaptations soit selon leur appartenance à un terroir bien précis soit selon leur matrice d'origine. Les caractéristiques phénotypiques et fermentaires des souches sont très nombreuses et semblent parfois difficiles à relier avec leur génome. L'identification de deux groupes de souches très proches du point de vue génomique, mais seulement adaptés à un type de produit (vin blanc et vin rouge de Bourgogne) lors d'une étude sur la diversité nous a donc questionné sur les capacités d'adaptation et de résistance à différents types de stress. De plus, la volonté des industriels à sélectionner des souches de plus en plus performantes nécessite la compréhension et la caractérisation des paramètres pouvant limiter leur adaptation aux vins.

Les levains malolactiques sont apparus dans l'histoire de l'élaboration des vins dans le but de maîtriser la FML et ils peuvent être définis comme étant des souches bactériennes initialement isolées de vins d'intérêts au cours de fermentations malolactiques spontanées et remplissant tous les critères de sélection en laboratoire et au niveau industriel. Parmi les nombreux tests réalisés lors de leur sélection, la survie et la croissance des souches en conditions stressantes sont évaluées ainsi que les différents paramètres de la FML et les propriétés métaboliques des levains. De plus, les souches doivent obligatoirement être capables de survivre au processus de production consistant en une succession de stress environnementaux et chimiques aboutissant à la lyophilisation ce qui favorise ainsi leur survie à l'inoculation dans le vin.

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité caractériser les deux groupes de souches VB et VR ainsi que des levains industriels lyophilisés ou non vis-à-vis de leur capacité de survie en présence de stress acide et d'extraits de polyphénols. En parallèle, grâce à l'étude du protéome de plusieurs souches nous avons également souhaité rechercher des nouveaux mécanismes de résistance aux stress.

Dans un premier temps, la caractérisation des souches VB et VR de Bourgogne a montré des différences majeures entre les deux groupes. Les souches isolées de vin blanc semblent s'adapter de manière précoce dans le moût blanc permettant ainsi d'effectuer une acclimatation progressive au stress du vin blanc (acidité et éthanol). Néanmoins, ces mêmes souches ne résistent pas ou peu à la présence de polyphénols. D'un autre côté, les souches isolées de vin rouge s'adaptent mieux dans le vin rouge et résistent de manière plus importante à l'augmentation de la concentration en polyphénols lorsqu'ils sont ajoutés dans cette matrice exclusivement. Ces caractéristiques phénotypiques sont néanmoins difficiles à corrélérer avec les données morphologiques du fait du peu de souches visualisées au MET, ainsi qu'avec les

données génomiques. En effet, la présence ou non de gènes n'est pas forcément associée à un phénotype précis.

Cependant ces résultats semblent être en adéquation avec l'hypothèse que ces groupes de souches « sœurs » dériveraient d'un même ancêtre commun, mais elles se seraient par la suite adaptées à deux produits aux caractéristiques différentes.

Dans un second temps, lors de notre travail sur l'effet de l'acidité sur les levains malolactiques commerciaux nous a permis d'observer de forte variabilité de survie entre les souches, bien que préparées de manière identique. L'étude protéomique sur la souche LAL01 (préparée en culture liquide) en condition acide nous a donné la possibilité d'observer des mécanismes bien connus de la résistance à l'acidité par exemple l'activation de l'ATP synthase. Concomitamment, l'acidité semble activer d'autres mécanismes dont le plus surprenant peut être celui du switch fermentaire passant ainsi de la voie des pentoses phosphates à la voie de Embden Meyerhof notamment de par la sur-expression de la Fructose biphosphate aldolase.

Enfin une partie importante de ce travail a porté sur l'étude de l'effet des polyphénols sur la survie des souches commerciales ainsi que sur l'identification de nouveaux mécanismes de résistance en fonction de la concentration en extrait polyphénolique ajouté. Nous avons ainsi remarqué que les souches commerciales lyophilisées présentaient une bonne standardisation de leur survie lors de l'ajout de concentration croissante en extraits polyphénoliques.

Cette dernière partie a donc nécessité de nombreuses mises au point intégrant les contraintes engendrées par des conditions œnologiques. Tout d'abord une première série de mise au point a été effectuée concernant l'extraction d'ARN totaux de qualité ayant été en contact prolongé avec les polyphénols. Puis dans un second temps, une deuxième série de mise au point a été engagée afin de développer une méthode de purification d'échantillons cellulaire contenant des polyphénols pour l'extraction et la quantification de protéines. Ce protocole basé sur l'utilisation d'une colonne chargée en PVPP a montré des résultats prometteurs.

On remarque dans cette étude protéomique sur l'effet des polyphénols, de nombreuses protéines notamment les protéines membranaires sont sous-exprimées. Néanmoins, de manière singulière, quelques protéines semblent se démarquer de par leur niveau d'expression. Ainsi le point central dans cette étude protéomique comme celle effectuée dans le chapitre 2 est la présence de ce qui semblerait être un switch fermentaire chez la souche LAB6 passant d'un métabolisme hétérofermentaire à un semi-métabolisme homofermentaire avec la capacité à effectuer la voie de Embden Meyerhof à partir de l'enzyme fructose bisphosphate aldolase. Les données génomiques à notre disposition ainsi que ces résultats vont dans la direction d'une

nécessité énergétique pour les souches d'effectuer cette voie dans le but de survivre ou réaliser d'autres mécanismes de résistance.

De plus, la souche LAB6 qui possède des éléments génétiques mobiles modifie de manière intéressante l'expression de certaines protéines lors de l'ajout de concentrations croissantes en polyphénols. Ces éléments génétiques mobiles semblent donc également réagir à leur présence tout comme les gènes propres à l'hôte.

Néanmoins, les résultats obtenus dans les différents chapitres ouvrent de multiples perspectives de travail comme par exemple la comparaison de la réponse au stress de souches préparées sous forme de levains ou non, notamment par l'utilisation d'analyse type 'omics afin de comprendre quels sont les systèmes activés lors de la préparation industrielle des souches.

De plus, en ce qui concerne les groupes de souches VB et VR, il serait intéressant d'approfondir le travail engagé en mettant en place une étude protéomique et métabolomique afin d'identifier quels sont les mécanismes de résistance privilégiés dans chaque groupe de souches.

Enfin, un des points les plus inattendus ayant été mis en exergue lors des analyses protéomiques est la sur-expression de la protéine Fba appartenant à la voie de Embden meyerhof. Ces résultats nécessiteraient donc une validation par dosage, soit des produits de fermentation, différents selon la voie fermentaire utilisée, soit des enzymes de la voie de la glycolyse en condition oenologique associé avec la variation de stress.

Références bibliographiques

- Aebersold, R. & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422 (6928). pp. 198–207.
- Alberto, M.R., Farías, M.E. & Manca de Nadra, M.C. (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (9). pp. 4359–4363.
- Amerine, M.A. & Roessler, E.B. (1976). *Wines. Their sensory evaluation*. W. H. Freeman & Co Ltd.
- Andrés-Barrao, C., Saad, M.M., Cabello Ferrete, E., Bravo, D., Chappuis, M.-L., Ortega Pérez, R., Junier, P., Perret, X. & Barja, F. (2015). Metaproteomics and ultrastructure characterization of *Komagataeibacter* spp. involved in high-acid spirit vinegar production. *Food Microbiology*. 55. pp. 1–11.
- Andrés-Barrao, C., Saad, M.M., Chappuis, M.-L., Boffa, M., Perret, X., Ortega Pérez, R. & Barja, F. (2012). Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. *Journal of proteomics*. 75 (6). pp. 1701–1717.
- Ansanay, V., Dequin, S., Blondin, B. & Barre, P. (1993). Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *Federation of European Biochemical Societies*. 332 (1-2). pp. 74–80.
- Antalick, G., Perello, M.C. & de Revel, G. (2012). Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60. pp. 12371–12383.
- Axelsson, L. & Ahrné, S. (2000). *Applied Microbial Systematics*. In: F. G. Priest & M. Goodfellow (eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 367–388.
- Årsköld, E., Lohmeier-Vogel, E., Cao, R., Roos, S., Rådström, P. & van Niel, E.W.J. (2008). Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *Journal of Bacteriology*. 190 (1). pp. 206–212.
- Bachmann, H., Starrenburg, M.J.C., Molenaar, D., Kleerebezem, M. & van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2012). Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research*. 22 (1). pp. 115–124.
- Badotti, F., Moreira, A.P.B., Tonon, L.A.C., de Lucena, B.T.L., Gomes, F. de C.O., Kruger, R., Thompson, C.C., de Moraes, M.A., Rosa, C.A. & Thompson, F.L. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106 (6). pp. 1259–1267.
- Bartowsky, E.J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation—moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11. pp. 174–187.
- Bartowsky, E.J. & Borneman, A.R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 92. pp. 441–447.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 96 (3). pp. 235–252.
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J. & Weidmann, S. (2016). Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine. *Frontiers in Microbiology*. 7. pp. 1–14.

- 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. *Research in microbiology*. 157 (3). pp. 267–274.
- Beney, L. & Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57 (1). pp. 34–42.
- Betteridge, A., Grbin, P. & Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology*. 33 (9). pp. 547–553.
- Bilhère, E., Lucas, P.M., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2009). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (5). pp. 1291–1300.
- Boido, E., Medina, K., Fariña, L. & Carrau, F. (2009). The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of Tannat red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. pp. 6271–6278.
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M. & Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (1). pp. E139–48.
- Bon, E., Delaherche, A., Bilhère, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A. & Le Marrec, C. (2009). *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (7). pp. 2079–2090.
- Booth, I.R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*. 78. pp. 19–30.
- Bordas, M., Araque, I., Bordons, A. & Reguant, C. (2015). Differential expression of selected *Oenococcus oeni* genes for adaptation in wine-like media and red wine. *Annals of microbiology*. 65. pp. 2277–2285.
- Borneman, A.R., Bartowsky, E.J., McCarthy, J. & Chambers, P.J. (2010). Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86 (2). pp. 681–691.
- Borneman, A.R., McCarthy, J.M., Chambers, P.J. & Bartowsky, E.J. (2012). Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics*. 13 (1). pp. 1–13.
- Bossi, A., Rinalducci, S., Zolla, L., Antonioli, P., Righetti, P.G. & Zapparoli, G. (2007). Effect of tannic acid on *Lactobacillus hilgardii* analysed by a proteomic approach. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (3). pp. 787–795.
- Bouix, M. & Ghorbal, S. (2015). Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 193. pp. 139–146.
- Bourdineaud, J.P. (2006). Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 107. pp. 274–280.
- Bravo-Ferrada, B.M., Brizuela, N., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., Semorile, L. & Tymczyszyn, E.E.

- (2015). Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. *Cryobiology*. 71 (3). pp. 522–528.
- Bridier, J., Claisse, O., Coton, M. & Coton, E. (2010). Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (23). pp. 7754–7764.
- Britz, T.J. & Tracey, R.P. (1990). The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*. 68. pp. 23–31.
- Brul, S. & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50. pp. 1–17.
- Campbell-Sills, H. (2015). Phylogenomic structure of *Oenococcus oeni* and its occurrence in different products unveiled by comparative genomics and metabolomics. *Manuscrit de thèse*. pp. 1–322.
- Campbell-Sills, H., Khoury, El, M., Favier, M., Romano, A., Biasioli, F., Spano, G., Sherman, D.J., Bouchez, O., Coton, E., Coton, M., Okada, S., Tanaka, N., Dols-Lafargue, M. & Lucas, P.M. (2015). Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome Biology and Evolution*. 7 (6). pp. 1506–1518.
- Campos, F.M., Couto, J.A. & Hogg, T.A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (2). pp. 167–174.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I.V., Rangel, A.O.S.S. & Hogg, T.A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 135 (2). pp. 144–151.
- Capozzi, V., Russo, P., Beneduce, L., Weidmann, S., Grieco, F., Guzzo, J. & Spano, G. (2010). Technological properties of *oenococcus oeni* strains isolated from typical southern italian wines. *Letters in applied microbiology*. 50 (3). pp. 327–334.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G. & Stefani, D. (2010). Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Systematic and Applied Microbiology*. (33). pp. 461–467.
- Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A. & Constant, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*. 211 (2). pp. 155–159.
- 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 (17). pp. 2988–2995.
- Chasseriaud, L., Krieger-Weber, S., Déléris-Bou, M., Sieczkowski, N., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2015). Hypotheses on the effects of enological tannins and total red wine phenolic compounds on *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*. 52. pp. 131–137.
- Chira, K. (2009). Structures moléculaires et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais. *Manuscrit de thèse*. pp. 1–228.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Maréchal, R., Marechal, P.-A. & Guzzo, J. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et*

- biophysica acta*. 1717 (2). pp. 118–124.
- Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H. & Dols-Lafargue, M. (2016). Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC Genomics*. 984 (17). pp. 1–19.
- Ciezack, G., Hazo, L., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud Funel, A. & Dols-Lafargue, M. (2010). Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *Journal of Applied Microbiology*. 108 (2). pp. 499–509.
- Corrieu, G. & Luquet, F.-M. (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. 3 June 2008. Lavoisier. Available from: [Accessed: 3 June 2017].
- Costantini, A., Rantsiou, K., Majumder, A., Jacobsen, S., Pessione, E., Svensson, B., Garcia-Moruno, E. & Cocolin, L. (2015). Complementing DIGE proteomics and DNA subarray analyses to shed light on *Oenococcus oeni* adaptation to ethanol in wine-simulated conditions. *Journal of proteomics*. 123. pp. 114–127.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L. & Guzzo, J. (2005a). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology*. 105 (3). pp. 463–470.
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P. & Guzzo, J. (2005b). A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochimica et biophysica acta*. 1720. pp. 92–98.
- Coulon, J., Houlès, A., Dimopoulou, M., Maupeu, J. & Dols-Lafargue, M. (2012). Lysozyme resistance of the ropy strain *Pediococcus parvulus* IOEB 8801 is correlated with beta-glucan accumulation around the cell. *International Journal of Food Microbiology*. 159 (1). pp. 25–29.
- Couto, J.A., Rozès, N. & Hogg, T. (1996). Ethanol-induced changes in the fatty acid composition of *Lactobacillus hilgardii*, its effects on plasma membrane fluidity and relationship with ethanol tolerance. *Journal of Applied Microbiology*. 81 (2). pp. 126–132.
- Cox, D.J. & Henick-Kling, T. (1989). Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology*. 171 (10). pp. 5750–5752.
- Cox, D.J. & Henick-Kling, T. (1995). Protonmotive force and ATP generation during malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46 (3). pp. 319–323.
- Cruz-Pio, L.E., Poveda, M., Alberto, M.R., Ferrer, S. & Pardo, I. (2017). Exploring the biodiversity of two groups of *Oenococcus oeni* isolated from grape musts and wines: Are they equally diverse? *Systematic and Applied Microbiology*. 40 (1). pp. 1–10.
- Da Silveira, M.G. & Abee, T. (2009). Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (5). pp. 1690–1696.
- Da Silveira, M.G., Golovina, E.A., Hoekstra, F.A., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2003). Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (10). pp. 5826–5832.
- Da Silveira, M.G., Vitoria San Romao, M., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2002). Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12). pp. 6087–6093.

- Davis, C.R., Wibowo, D. & Eschenbruch, R. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36 (4). pp. 290–301.
- de Gaulejac, N.V., Vivas, N., Absalon, C. & Nonier, M.F. (2001). Identification of procyanidin A2 in grape and wine of *Vitis vinifera* L. cv: Merlot noir and Cabernet Sauvignon. *Journal International Science Vigne Vin*. 35 (1). pp. 51–56.
- de Revel, G., Martin, N. & Pripis-Nicolau, L. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. pp. 4003–4008.
- Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H. & Trevors, J.T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*. 52 (2). pp. 149–182.
- Derré, I., Rapoport, G. & Msadek, T. (1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 31 (1). pp. 117–131.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. & Collins, M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45 (2). pp. 395–397.
- Dimopoulou, M. (2013). Les polysaccharides de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, de l'élucidation de leurs structures et voies de biosynthèse à leur valorisation technologique. *Manuscrit de thèse*. pp. 1–190.
- Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O., Doco, T., Petrel, M., Lucas, P. & Dols-Lafargue, M. (2016). Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiology*. 53. pp. 10–17.
- Dimopoulou, M., Hazo, L. & Dols-Lafargue, M. (2012). Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *International Journal of Food Microbiology*. 153 (1). pp. 114–122.
- Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., Roques, M., Williams, P., Petrel, M., Gontier, E., Moulis, C., Remaud-Simeon, M. & Dols-Lafargue, M. (2014). Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni* : From Genes to Phenotypes. *PLoS ONE*. 9 (6). p. e98898.
- Dols-Lafargue, M., Gindreau, E., Le Marrec, C., Chambat, G., Heyraud, A. & Lonvaud-Funel, A. (2007). Changes in red wine soluble polysaccharide composition induced by malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (23). pp. 9592–9599.
- Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G. & Lonvaud Funel, A. (2008). Characterization of *gtf*, a Glucosyltransferase Gene in the Genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, Two Bacterial Species Commonly Found in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (13). pp. 4079–4090.
- Dombek, K.M. & Ingram, L.O. (1984). Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of Bacteriology*. 157 (1). pp. 233–239.
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J.A., Teissedre, P.-L. & Saucier, C. (2007). Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (4). pp. 1109–

1116.

- Duenas, M., Irastorza, A. & Fernandez, K. (1994). Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of food Science*. 59 (5). pp. 1060–1064.
- Endo, A. (2006). *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 (10). pp. 2345–2348.
- Fahey, R.C., Brown, W.C., Adams, W.B. & Worsham, M.B. (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 133 (3). pp. 1126–1129.
- Fang, T.J. & JP, D. (1993). Antimicrobial activity of sulfur dioxide to certain lactic acid bacteria isolated from wines. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*. 26 (3). pp. 116–131.
- Favier, M., Bilhère, E., Lonvaud-Funel, A., Moine, V. & Lucas, P.M. (2012). Identification of pOENI-1 and related plasmids in *Oenococcus oeni* strains performing the malolactic fermentation in wine. *PLoS ONE*. 7 (11). p. e49082.
- Fernandez, K., Duenas, M. & Irastorza, A. (1996). Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus* spp. strains isolated from Basque Country ciders. *Journal of Food Protection*.
- Figueiredo, A.R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T. & Couto, J.A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*. 25 (1). pp. 105–112.
- Fortier, L.-C., Tourdot-Maréchal, R.L., Diviães, C., Lee, B.H. & Guzzo, J. (2003). Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 222 (2). pp. 165–169.
- Fourcassie, P., Makaga-Kabinda-Massard, E., Belardi, A. & Maujean, A. (1992). Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *Journal of Applied Bacteriology*. 73. pp. 489–496.
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. & Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*. 341 (8843). pp. 454–457.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. & Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. pp. 890–894.
- Franquès, J., Araque, I., Palahí, E., del Carmen Portillo, M., Reguant, C. & Bordons, A. (2017). Presence of *Oenococcus oeni* and other lactic acid bacteria in grapes and wines from Priorat (Catalonia, Spain). *LWT-Food Science and Technology*. pp. 326–334.
- Galland, D., Tourdot-Maréchal, R., Abraham, M., Chu, K.S. & Guzzo, J. (2003). Absence of Malolactic Activity Is a Characteristic of H⁺-ATPase-Deficient Mutants of the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (4). pp. 1973–1979.
- Gambaro, A., Boido, E., Zlotajabko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E. & Carrau, F. (2001). Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 7 (1). pp. 27–32.

- Gammacurta, M., Marchand, S., Moine, V. & de Revel, G. (2017). Influence of different yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red Bordeaux wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 44. pp. 1–12.
- Garbay, S. & Funel, A.L. (1996). Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *Journal of Applied Bacteriology*. 81. pp. 619–625.
- Garbay, S. & Lonvaud Funel, A. (1994). Characterization of membrane-bound ATPase activity of *Leuconostoc oenos*: growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41 (5). pp. 597–602.
- Garbay, S., Rozès, N. & Lonvaud Funel, A. (1995). Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. *Food Microbiology*. 12. pp. 387–395.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Alvarez, P.J. & Moreno-Arribas, M.V. (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 107 (3). pp. 1042–1053.
- García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E.M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M.V. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control*. 28 (2). pp. 212–219.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J. & Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 145 (2-3). pp. 426–431.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J. & Bartolomé, B. (2013). Polyphenols as a natural alternative to the use of sulphites in winemaking. *Internet Journal of Enology and Viticulture*. 7 (1). pp. 1–5.
- Garvie, E.I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp.nov. *Journal of General Microbiology*. 48 (3). pp. 431–438.
- Grandvalet, C., Assad-García, J.S., 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. pp. 2611–2619.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C. & Guzzo, J. (2005). CtsR Is the Master Regulator of Stress Response Gene Expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology*. 187 (16). pp. 5614–5623.
- Grimaldi, A. & McLean, H. (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51 (4). pp. 362–369.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E. & Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 105 (2). pp. 233–244.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P. & Vincenzini, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains

- isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology*. 83 (1). pp. 1–14.
- Guerzoni, M.E., Sinigaglia, M. & Gardini, F. (1995). Effects of pH, temperature, ethanol, and malate concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: modelling of the malolactic activity. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46 (3). pp. 368–374.
- Guilloux-Benatier, M. (1985). Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin: effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis*. 24. pp. 59–74.
- Guzzo, J., Cavin, J.F. & Divies, C. (1994). Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnology letters*. 16 (11). pp. 1189–1194.
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M.P., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J.F. & Divies, C. (1997). A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in applied microbiology*. 24 (5). pp. 393–396.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*. 55 (1-3). pp. 27–31.
- Guzzo, J., Jobin, M.P. & Divies, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*. 160. pp. 43–47.
- Hanna, M.N., Ferguson, R.J., Li, Y.H. & Cvitkovitch, D.G. (2001). *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*. 183 (20). pp. 5964–5973.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M. & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry*. 75 (6). pp. 1300–1306.
- Hemingway, R.W. & Laks, P.E. (2012). *Plant Polyphenols*. Springer Science & Business Media.
- Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. 27 (1). pp. 27–40.
- Hendrick, J.P. & Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 62. pp. 349–384.
- Henick-Kling, T. (1993). *Malolactic fermentation*. 18 May 1993. Wine microbiology and biotechnology. Available from: [Accessed: 18 May 2017].
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual review of biochemistry*. 54. pp. 237–271.
- Hoshino, N., Kimura, T., Yamaji, A. & Ando, T. (1999). Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes. *Free Radical Biology and Medicine*. 27 (11-12). pp. 1245–1250.
- Hua, L., WenYing, Z., Hua, W. & ZhongChao, L. (2009). Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. *Food and Bioproducts processing*. 87. pp. 56–61.
- Ibarburu, I. & Díaz, M.S. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology*. 103. pp. 477–486.

- 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. *International Journal of Food Microbiology*. 166 (2). pp. 331–340.
- Jin, J., Zhang, B., Guo, H., Cui, J., Jiang, L., Song, S., Sun, M. & Ren, F. (2012). Mechanism Analysis of Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by Gene Expression Profile Using RNA-Sequencing Y.-F. Chang (ed.). *PLoS ONE*. 7 (12). p. e50777.
- Jobin, M.P., Garmyn, D., Divies, C. & Guzzo, J. (1999). Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology*. 145 (5). pp. 1245–1251.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. (2013). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*. 42. pp. D199–D205.
- Kang, T.S., Korber, D.R. & Tanaka, T. (2013). Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (24). pp. 7818–7826.
- Kennedy, J.A., Hayasaka, Y. & Vidal, S. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. pp. 5348–5365.
- Khoury, El, M. (2014). Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles. *Manuscrit de thèse*. pp. 1–149.
- Khoury, El, M., Campbell-Sills, H., Salin, F., Guichoux, E., Claisse, O. & Lucas, P.M. (2016). Biogeography of *Oenococcus oeni* reveals distinctive but non-specific populations in wine-producing regions. *Applied and Environmental Microbiology*. 83 (1). pp. AEM.02322–16.
- Koponen, J., Laakso, K., Koskeniemi, K., Kankainen, M., Savijoki, K., Nyman, T.A., de Vos, W.M., Tynkkynen, S., Kalkkinen, N. & Varmanen, P. (2012). Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of proteomics*. 75 (4). pp. 1357–1374.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y. & van Leeuwen, C. (2006). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (14). pp. 5077–5086.
- Labarre, C., Divies, C. & Guzzo, J. (1996). Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12). pp. 4493–4498.
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D. & Monti, J.-P. (2006). PVPP-polyphenol complexes: a molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (12). pp. 4383–4389.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. & Ribéreau-Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic Acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 46 (4). pp. 874–880.
- Larisika, M., Claus, H. & König, H. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *International*

- Journal of Food Microbiology*. 123 (1-2). pp. 171–176.
- Letenneur, L. (2007). Moderate alcohol consumption and risk of developing dementia in the elderly: the contribution of prospective studies. *Annals of epidemiology*. 17 (5). pp. 1–10.
- Li, Y., Hugenholtz, J. & Abee, T. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (10). pp. 5739–5745.
- Lithgow, J.K., Hayhurst, E.J., Cohen, G., Aharonowitz, Y. & Foster, S.J. (2004). Role of a cysteine synthase in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 186 (6). pp. 1579–1590.
- Liu, J., Deng, Y., Peters, B.M., Li, L., Li, B., Chen, L., Xu, Z. & Shirtliff, M.E. (2016). Transcriptomic analysis on the formation of the viable putative non-culturable state of beer-spoilage *Lactobacillus acetotolerans*. *Scientific Reports*. 6 (1). pp. 1–11.
- Liu, L., Zhao, H., Peng, S., Wang, T., Su, J., Liang, Y., Li, H. & Wang, H. (2017). Transcriptomic Analysis of *Oenococcus oeni* SD-2a Response to Acid Shock by RNA-Seq. *Frontiers in Microbiology*. 8. p. 1586.
- Llaubères, R.M., Richard, B. & Lonvaud, A. (1990). Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic bacteria. *Carbohydrate Research*. 203. pp. 103–107.
- Lombardi, S.J., Tremonte, P., Succi, M., Testa, B., Pannella, G., Tipaldi, L., Sorrentino, E., Coppola, R. & Iorizzo, M. (2012). Effect of phenolic compounds on the growth and l-malic acid metabolism of *Oenococcus oeni*. *Journal of Life Sciences*. 6. pp. 1225–1231.
- Lonvaud Funel, A. & de Saad, A.M. (1982). Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Applied and Environmental Microbiology*. 43 (2). pp. 357–361.
- Lonvaud, M. (1975). *Recherches sur l'enzyme des bactéries lactiques du vin assurant la transformation du malate en lactate*. Manuscrit de thèse.
- Lonvaud, M., Lonvaud Funel, A. & Ribéreau-Gayon, P. (1977). Le mécanisme de la fermentation malolactique des vins. *Connaissance Vigne et Vin*. 11 (1). pp. 73–91.
- Lonvaud-Funel, A., Guilloux, Y. & Joyeux, A. (1993). Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *Journal of Applied Bacteriology*. 74 (1). pp. 41–47.
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M.J., Lindley, N.D. & Pareilleux, A. (1992). Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *Journal of Bacteriology*. 174 (16). pp. 5302–5308.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M. & Dizy, M. (2007). Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology*. 226. pp. 215–223.
- Lu, Y.J. & Rock, C.O. (2006). Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. 59 (2). pp. 551–566.
- Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (10). pp. 2973–2980.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (42). pp. 15611–15616.
- Makarova, K.S. & Koonin, E.V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189 (4). pp. 1199–1208.
- Manca de Nadra, M.C. & Strasser de Saad, A.M. (1995). Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *International Journal of Food Microbiology*. 27 (2-3). pp. 101–106.
- Marchand, S., de Revel, G. & Bertrand, A. (2000). Approaches to wine aroma: release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (10). pp. 4890–4895.
- Marcobal, A.M., Sela, D.A., Wolf, Y.I., Makarova, K.S. & Mills, D.A. (2008). Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *Journal of Bacteriology*. 190 (2). pp. 564–570.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Bordons, A. & Reguant, C. (2017). Genetic and transcriptional study of glutathione metabolism in *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 242. pp. 61–69.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Bordons, A., Reguant, C. & Bautista-Gallego, J. (2016a). Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* adaptation to wine stress conditions. *Frontiers in Microbiology*. 7. pp. 1–18.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Weidmann, S., Guzzo, J., Bordons, A. & Reguant, C. (2016b). Protective role of glutathione addition against wine-related stress in *Oenococcus oeni*. *Food Research International*. 90. pp. 8–15.
- Marques, A.P., Duarte, A.J., Chambel, L., Teixeira, M.F., San Romão, M.V. & Tenreiro, R. (2011). Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. *International Microbiology*. 14 (3). pp. 155–162.
- Martineau, B. & Henick-Kling, T. (1995). Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *Journal of Applied Bacteriology*. 78 (5). pp. 526–536.
- Mcdaniel, M., Henderson, L.A., Watson, B.T., Heatherbell, D. & Heatherbell, J.R. (1987). Sensory panel training and screening for descriptive analysis of the aroma of pinot noir wine fermented by several strains of malolactic bacteria. *Journal of Sensory Studies*. 2. pp. 149–167.
- McManus, J.P., Davis, K.G., Beart, J.E., Gaffney, S.H., Lilley, T.H. & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*. (9). p. 1429.
- Mills, D.A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D. & Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS microbiology reviews*. 29 (3). pp. 465–475.

- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M. & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*. 58 (8). pp. 1935–1945.
- Mori, K., Sugaya, S. & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*. 105. pp. 319–330.
- Mozzi, F., Raya, R.R. & Vignolo, G.M. (2015). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Second Edition. 3 May 2015. Available from: [Accessed: 3 May 2017].
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., Chaffaut, du, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D. & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*. 2010. pp. 1–9.
- Nguyen, H.T., Razafindralambo, H. & Blecker, C. (2014). Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. *Biochemical Engineering Journal*. 88. pp. 85–94.
- Olguín, N., Bordons, A. & Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*. 26 (2). pp. 197–203.
- Olguín, N., Bordons, A. & Reguant, C. (2010). Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 144 (1). pp. 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 Microbiology*. 51. pp. 87–95.
- Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S. & Bretelier, M.B. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue Neurologique*. 153 (3). pp. 185–192.
- Ortega-Regules, A. & Romero-Cascales, I. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica chimica acta*. 563. pp. 26–32.
- Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*. Tome 45. pp. 913–916.
- Perron de Revel, du, G. (1992). Le diacétyle, les composés dicarbonylés et leurs produits de réactions dans les vins. *Manuscrit de thèse*. pp. 1–172.
- Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T. & Hess, M. (2015). Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Frontiers in Microbiology*. 6. p. 809.
- Pieterse, B., Leer, R.J. & Schuren, F. (2005). Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*. 151. pp. 3881–3894.
- Pophaly, S.D., Singh, R., Pophaly, S.D., Kaushik, J.K. & Tomar, S.K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 11 (1). pp. 1–14.
- Pramateftaki, P.V., Metafa, M., Karapetrou, G. & Marmaras, G. (2012). Assessment of the genetic

- polymorphism and biogenic amine production of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Greek red wines. *Food Microbiology*. 29 (1). pp. 113–120.
- Prunier, A.L. & Leclercq, R. (2005). Role of *mutS* and *mutL* Genes in Hypermutability and Recombination in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 187 (10). pp. 3455–3464.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S.D. & Maguin, E. (2000). Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology*. 35 (3). pp. 517–528.
- Ramos, A., Lolkema, J.S. & Konings, W.N. (1995). Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (4). pp. 1303–1310.
- Ramos, A., Poolman, B., Santos, H., Lolkema, J.S. & Konings, W.N. (1994). Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. *Journal of Bacteriology*. 176 (16). pp. 4899–4905.
- Rankine, B.C. & Pocock, K.F. (1969). Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 20 (2). pp. 104–109.
- Reguant, C. & Bordons, A. (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 95 (2). pp. 344–353.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L. & Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (6). pp. 1065–1071.
- Reguant, C., CarretÃ, R., ConstantÃ, M. & Bordons, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiology Letters*. 246 (1). pp. 111–117.
- Renaud, S.C., Guéguen, R. & Siest, G. (1999). Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. *Archives of Internal Medicine*. 159. pp. 1865–1870.
- Renouf, V., Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75 (1). pp. 149–164.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de la Societe chimique de France*. 9. pp. 2649–2652.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1966). *Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure*. Chimie analytique.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A. (2012a). *Traité d'oenologie - Tome 1 - 6e éd. - Microbiologie du vin. Vinifications*. Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (2012b). *Traité d'oenologie - Tome 2 - 6e éd. - Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Dunod.
- Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual review of microbiology*. 50. pp. 285–315.

- Rodríguez Vaquero, M., Alberto, M.R. & de Nadra, M.C.M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18 (2). pp. 93–101.
- Romano, P. & Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. *Wine microbiology and biotechnology*. pp. 373–393.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A. & Pappin, D.J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 3 (12). pp. 1154–1169.
- Rozès, N. & Peres, C. (1996). Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45. pp. 839–843.
- Rozès, N. & Peres, C. (1998). Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49 (1). pp. 108–111.
- Rozès, N., Arola, L. & Bordons, A. (2003). Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine. *Letters in applied microbiology*. 36 (5). pp. 337–341.
- Saier, M.H., Ye, J.J., Klinke, S. & Nino, E. (1996). Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase system and evidence for the Embden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*. 178 (1). pp. 314–216.
- Salema, M., Lolkema, J.S., Romão, M.V.S. & Dias, M.C.L. (1996). The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of Bacteriology*. 178 (11). pp. 3127–3132.
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J.S., Dias, M.C. & Konings, W.N. (1994). Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *European journal of biochemistry*. 225 (1). pp. 289–295.
- Saucier, C., Mirabel, M., Daviaud, F., Longieras, A. & Glories, Y. (2001). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (12). pp. 5732–5735.
- Sauvageot, F. & Vivier, P. (1997). Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 48 (2). pp. 187–192.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30 (12). pp. 3875–3883.
- Schindelin, J., Rueden, C.T. & Hiner, M.C. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction & Development*. 82. pp. 518–529.
- Serrano, L.M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P.A., de Vos, W.M. & Smid, E.J. (2007). Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories*. 6. pp. 1–14.
- Seydlová, G., Halada, P., Fišer, R., Toman, O., Ulrych, A. & Svobodová, J. (2012). DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress.

- Journal of Applied Microbiology*. 112 (4). pp. 765–774.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68. pp. 850–858.
- Silveira, M.G., Baumgartner, M., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2004). Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (5). pp. 2748–2755.
- Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. & Ross, R.P. (2010). Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (2). pp. 500–507.
- Sternes, P.R. & Borneman, A.R. (2016). Consensus pan-genome assembly of the specialised wine bacterium *Oenococcus oeni*. *BMC Genomics*. 17 (308). pp. 1–15.
- Sternes, P.R., Costello, P.J., Chambers, P.J., Bartowsky, E.J. & Borneman, A.R. (2017). Whole transcriptome RNAseq analysis of *Oenococcus oeni* reveals distinct intra-specific expression patterns during malolactic fermentation, including genes involved in diacetyl metabolism. *International Journal of Food Microbiology*. 257. pp. 216–224.
- Sumby, K.M., Grbin, P.R. & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 121 (1). pp. 1–16.
- Swan, T.M. & Watson, K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology*. 43 (1). pp. 70–77.
- Teissedre, P.L., Frankel, E.N. & Waterhouse, A.L. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of Science Food and Agriculture*. 70. pp. 55–61.
- Teixeira, H., Goncalves, M.G., Rozès, N. & Ramos, A. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microbial ecology*. 43. pp. 146–153.
- Terrade, N. & Mira de Orduña, R. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*. 133 (1-2). pp. 8–13.
- Thiery, J.P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur couples fines en microscopie électronique. *Microscopie*. 6. pp. 987–1018.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39 (4-5). pp. 499–505.
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L.-C., Guzzo, J., Lee, B. & Diviès, C. (1999). Acid sensitivity of noemycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relation ship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters*. 178 (2). pp. 319–326.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L. & Divies, C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 55 (1-3). pp. 269–273.
- Török, Z., Horváth, I. & Goloubinoff, P. (1997). Evidence for a lipochaperonin: association of active

- protein folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions*. In: 1997, pp. 2192–2197.
- Tracey, R.P. & Britz, T.J. (1989). Cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology*. 66 (5). pp. 445–456.
- Trevisan, M. (2017). Comparaison des potentiels aromatiques de souches d'*Oenococcus oeni* adaptées à deux types de vin. *Manuscrit de Master*. pp. 1–79.
- Trujillo, M. (2015). Etude de la tolérance au pH et à l'éthanol de souches d'*Oenococcus oeni* de différents groupes génétiques. *Manuscrit de Master*. pp. 1–61.
- van de Guchte, M., Serrero, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D. & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82. pp. 187–216.
- van den Hemel, D., Brigé, A., Savvides, S.N. & Van Beeumen, J. (2006). Ligand-induced conformational changes in the capping subdomain of a bacterial old yellow enzyme homologue and conserved sequence fingerprints provide new insights into substrate binding. *The Journal of biological chemistry*. 281 (38). pp. 28152–28161.
- van der Meulen, S.B., de Jong, A. & Kok, J. (2017). Early Transcriptome Response of *Lactococcus lactis* to Environmental Stresses Reveals Differentially Expressed Small Regulatory RNAs and tRNAs. *Frontiers in Microbiology*. 8.
- Van Oevelen, D. & Verachtert, H. (1878). *Slime production by brewery strains of Pediococcus cerevisiae*. Am. Soc. Brew. Chem.
- Vivas, N., Augustin, M. & Lonvaud Funel, A. (2000). Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (11). pp. 1675–1678.
- Vivas, N., Lonvaud Funel, A. & Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiology*. 14 (3). pp. 291–300.
- Werning, M.L., Ibarburu, I. & Dueñas, M.T. (2006). *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and Beverages. *Journal of Food Protection*. 69 (1). pp. 161–169.
- Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*. 34. pp. 415–420.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. & Lee, T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36 (4). pp. 302–313.
- Wightman, J.D., Price, S.F. & Watson, B.T. (1997). Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 48 (1). pp. 39–48.
- Wu, C., Zhang, J., Chen, W., Wang, M., Du, G. & Chen, J. (2012). A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93 (2). pp. 707–722.

- Zapparoli, G., Fracchetti, F. & Stefanelli, E. (2012). Genetic and phenotypic strain heterogeneity within a natural population of *Oenococcus oeni* from Amarone wine. *Journal of Applied Microbiology*. pp. 1–10.
- Zeller, T. & Klug, G. (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Die Naturwissenschaften*. 93 (6). pp. 259–266.
- Zhang, J., Fu, R.-Y., Hugenholtz, J., Li, Y. & Chen, J. (2007). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (16). pp. 5268–5275.
- Zhang, Y.M. & Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature reviews Microbiology*.
- Zhao, G. & Zhang, G. (2009a). Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 135 (1). pp. 64–67.
- Zhao, G. & Zhang, G. (2009b). Influences of protectants, rehydration media and storage on the viability of freeze-dried *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (10). pp. 1801–1806.

Communications scientifiques

Communications orales

Breniaux, M. ; Dutilh, L. ; Petrel, M. ; Gontier, E. ; Jourdes, M. ; Teissedre, PL. ; Silvano, A. ; Kriger, S. ; Bou, M. ; Lucas, P. ; *Oenococcus oeni* strains from two different genetic groups are phenotypically adapted to ferment white or red wines of Burgundy. Wine Active Compounds (WAC) – Mars 2017, Beaune, FRANCE.

Publications dans des journaux à comité de lecture

Breniaux, M. ; Dutilh, L. ; Petrel, M. ; Gontier, E. ; Deleris Bou, M.; Krieger, S. ; Jourdes, M. ; Teissedre, P L. ; Lucas, P. ; Phenotypic characterization of two groups of *Oenococcus oeni* strain. Soumis Septembre 2017.

Martineau, AS. ; Nguyen, P. ; **Breniaux, M.** ; Talbot, C. ; Burger, M. ; Thorin, C. ; Leray, V. ; Ouguerram, K. ; Intake of curcuma extract with a mixture of EPA and DHA does not modify the effects of omega-3 on lipid metabolism and improved insulin sensitivity parameters in dogs. European Journal of Nutrition. Soumis Mars 2017.

Campbell-Sills, H. ; Capozzi, V. ; Romano, A. ; Cappellin, L. ; Spano, G. ; **Breniaux, M.** ; Lucas, P. ; Biasioli, F. ; Advances in wine analysis by PTR-ToF-MS: Optimization of the method and discrimination of wines from different geographical origins and fermented with different malolactic starters. International Journal of Mass Spectrometry. Février 2016.

Communications affichées

Breniaux, M. ; Campbell-Sills, H. ; Trevisan, M. ; Miot Sertier, C. ; Lucas, P. ; Genomic and phenotypic characterization of two groups of *Oenococcus oeni* strains adapted to ferment white or red wines of Burgundy. Lactic Acid Bacteria (LAB) – Aout 2017, Egmond aan Zee, PAYS BAS.

Breniaux, M. ; Lucas, P. ; Recherche des mécanismes d'inhibition des bactéries lactiques par les polyphénols du vin. Journée de l'école doctorale (JED), Avril 2016, Arcachon, FRANCE

Breniaux, M. ; Lucas, P. ; Recherche des mécanismes d'inhibition des bactéries lactiques par les polyphénols du vin. Journée de l'école doctorale (JED), Avril 2015, Arcachon, France

Annexes

Annexe 1 : Protéines non mappées sur le génome de PSU1 pour l'EP n° 1 au différentes modalités de comparaison de pH.

Comparaison pH2,8 /pH4 :

N° accession	Description	Ratio
A0A0E2V5Q0	cation transporter Sodium	1,178
A0A0E2V7K9	LacI family transcriptional regulator	1,155
A0A0E2V7V4	trehalase	1,577
A0A0E2V9D2	permease of Major facilitator transporter	0,761
A0A0E2X8R3	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	0,720
A0A0E2X9F4	integral component of membrane	1,166
A0A0E2X9K5	Transcriptional regulator	0,839
A0A0E2X9K8	Uncharacterized protein	1,14
A0A0E2X9R0	Glutathione S-transferase	1,043
A0A0E2X9T1	integral component of membrane/cell membrane	1,163
A0A0E2XQV6	Uncharacterized protein	0,556
A0NHT9	integral component of membrane	1,172
A0NI56	Fructose-bisphosphate aldolase fba	1,105
A0NI59	levansucrase sacb	0,921
A0NIF6	Transcriptional regulator YtlR	1,095
A0NIQ5	Restriction system protein mrr	1,057
A0NIW7	integral component of membrane	0,936
A0NIX1	Uncharacterized protein	0,715
A0NIX2	Ribonuclease H rnhA	0,701
A0NIY2	Hypothetical site specific DNA-methyltransferase	0,954
A0NJK1	ATP binding	0,816
A0NJL6	Uncharacterized protein	1,085
A0NJP9	Uncharacterized protein	0,969
A0NK21	tRNA(Ile)-lysidine synthase	0,785
A0NK58	Uncharacterized protein	0,996
A0NK60	integral component of membrane	1,084
A0NK80	Uncharacterized protein	1,314
A0NK83	Uncharacterized protein	0,907
A0NKB6	Dehydrogenase, FAD/FMN-containing	0,899
A0NKK5	Phosphoribosylamine--glycine ligase purD	1,127
A0NKX9	Assimilatory nitrite reductase, subunit nasD	1,272
A0NKY4	DNA binding / régulateur de transcription	1,938
D3L7L7	Uncharacterized protein	0,891
D3L852	Elongation factor 4 lepA	1,016
D3L863	integral component of membrane	0,924
D3L8Z2	DNA binding sequence specific	0,726
D3L987	argininosuccinate lyase activity	1,371
D3L9P0	oxidoreductase activity	1,011
D3LB71	alpha-L-arabinofuranosidase activity	1,135
D3LBD0	Polyphosphate kinase ppK	1,121
D3LC60	phage tail protein	0,602
D3LC74	phage fOg44	1,014
D3LCI7	phage phiS11/phiS13	1,381

Comparaison pH3/pH4 :

N° accession	Description	Ratio
A0A0E2V5Q0	cation transporter Sodium	0,889
A0A0E2V7K9	LacI family transcriptional regulator	1,048
A0A0E2V7V4	trehalase	0,908
A0A0E2V9D2	Major facilitator transporter	0,879
A0A0E2X8R3	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	0,604
A0A0E2X9F4	integral component of membrane	0,958
A0A0E2X9K5	Transcriptional regulator	1,034
A0A0E2X9K8	Uncharacterized protein	0,997
A0A0E2X9R0	Glutathione S-transferase	1,052
A0A0E2X9T1	integral component of membrane/cell membrane	0,981
A0A0E2XQV6	Uncharacterized protein	0,675
A0NHM8	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase ribA	0,844
A0NHT9	integral component of membrane	1,007
A0NI56	Fructose-bisphosphate aldolase fba	1,245
A0NI59	levansucrase sacb	0,694
A0NIF6	Transcriptional regulator YtlR	0,832
A0NIQ5	Restriction system protein mrr	0,89
A0NIW7	integral component of membrane	1,203
A0NIX1	Uncharacterized protein	1,164
A0NIX2	Ribonuclease H rnhA	0,687
A0NIY2	Hypothetical site specific DNA-methyltransferase	0,926
A0NJ15	permease	0,978
A0NJ81	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase plsC	1,000
A0NJK1	ATP binding	0,758
A0NJL6	Uncharacterized protein	0,972
A0NJP9	Uncharacterized protein	0,769
A0NK21	tRNA(Ile)-lysine synthase	0,981
A0NK58	Uncharacterized protein	1,065
A0NK60	integral component of membrane	1,375
A0NK80	Uncharacterized protein	1,132
A0NK83	Uncharacterized protein	1,178
A0NKB6	Dehydrogenase, FAD/FMN-containing	0,778
A0NKK5	Phosphoribosylamine--glycine ligase purD	0,941
A0NKX9	Assimilatory nitrite reductase, subunit nasD	1,308
A0NKY4	DNA binding	1,279
D3L7L7	Uncharacterized protein	0,977
D3L852	Elongation factor 4 lepA	1,116
D3L8Z2	DNA binding sequence specific	0,838
D3L987	argininosuccinate lyase activity	1,339
D3L9P0	oxidoreductase activity	0,801
D3LB71	alpha-L-arabinofuranosidase activity	0,856
D3LBD0	Polyphosphate kinase ppK	0,897
D3LC60	phage tail	0,370
D3LC74	phage fOg44	1,058
D3LCI5	phage Lp2 protein 18	0,834

Comparaison pH3,3/pH4 :

N° accession	Description	Ratio
A0A0E2V5Q0	cation transporter Sodium	1,026
A0A0E2V7K9	LacI family transcriptional regulator	1,022
A0A0E2V7V4	trehalase	1,036
A0A0E2V9D2	Major facilitator transporter	0,857
A0A0E2X8R3	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	0,852
A0A0E2X9F4	integral component of membrane	1,133
A0A0E2X9K5	Transcriptional regulator ArsR family	1,231
A0A0E2X9K8	Uncharacterized protein	1,022
A0A0E2X9R0	Glutathione S-transferase	1,202
A0A0E2X9T1	integral component of membrane/cell membrane	1,096
A0A0E2XQT6	Pyruvate phosphate dikinase	1,155
A0A0E2XQV6	Uncharacterized protein	0,725
A0NHM8	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase ribA	0,942
A0NHT9	integral component of membrane	1,042
A0NI56	Fructose-bisphosphate aldolase fba	1,226
A0NIF6	Transcriptional regulator YtlR	0,984
A0NIQ5	Restriction system protein mrr	0,944
A0NIW7	integral component of membrane	1,051
A0NIX1	Uncharacterized protein	1,036
A0NIX2	Ribonuclease H rnhA	0,835
A0NIY2	Hypothetical site specific DNA-methyltransferase	0,970
A0NJ81	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase plsC	0,898
A0NJK1	ATP binding	0,714
A0NJL6	Uncharacterized protein	0,991
A0NJM2	Uncharacterized protein	1,014
A0NJP9	Uncharacterized protein	0,899
A0NK21	tRNA(Ile)-lysine synthase	0,952
A0NK58	Uncharacterized protein	0,960
A0NK60	integral component of membrane	1,125
A0NK80	Uncharacterized protein	1,070
A0NK83	Uncharacterized protein	1,114
A0NKB6	Dehydrogenase, FAD/FMN-containing	0,881
A0NKK5	Phosphoribosylamine--glycine ligase purD	0,953
A0NKX9	Assimilatory nitrite reductase, subunit nasD	1,095
A0NKY4	DNA binding	1,204
A0NL99	Benzyl alcohol dehydrogenase	1,283
D3L7L7	Uncharacterized protein	1,042
D3L852	Elongation factor 4 lepA	1,005
D3L863	integral component of membrane	1,048
D3L8Z2	DNA binding sequence specific	0,941
D3L987	argininosuccinate lyase activity	1,179
D3L9P0	oxidoreductase activity	0,905
D3LB71	alpha-L-arabinofuranosidase activity	1,009
D3LBD0	Polyphosphate kinase ppK	0,899
D3LC60	phage tail	0,671
D3LC74	phage fOg44	1,084
D3LCI5	phage Lp2 protein 18	0,995
D3LCI6	phage phiS11	0,871
D3LCI7	phage phiS11/phiS13	0,700
D3LCR0	integral component of membrane	0,957

Annexe 2 : Protéines sous et sur-exprimées identifiées dans l'EP n° 1.

Protéines sous-exprimées communes à l'ensemble des conditions de pH étudiées et celles communes aux conditions de pH les plus acide (pH 2,8 et pH 3)

	N° accession	Description	Ratio pH2,8/ pH4	Ratio pH3/ pH4	Ratio pH3,3/ pH4
Protéines communes aux conditions pH 2,8 ; 3 et 3,3	A0NJS7	Transcriptional regulator, helix-turn-helix XRE-family	0,720	0,576	0,687
	D3LC60	phage protein	0,602	0,370	0,671
	A0A0E2VBD5	Uncharacterized protein	0,791	0,69	0,800
	A0A0E2V613	NADH-flavin reductase	0,639	0,745	0,775
	D3LB78	Protein tyrosine/serine phosphatase	0,703	0,624	0,677
	A0A0E2XQV6	Uncharacterized protein	0,556	0,675	0,725
Protéines communes aux conditions pH 2,8 et 3	A0NIX2	Ribonuclease H	0,701	0,687	
	Q04FX1	Acetyltransferase, including N-acetylase of ribosomal protein	0,783	0,749	
	A0NID3	Two-component sensor histidine kinase	0,784	0,765	
	A0NIW3	Uncharacterized protein	0,689	0,779	
	A0A0E2VPY5	Leucyl-tRNA synthetase	0,785	0,716	
	A0A0E2V825	PTS fructose transporter subunit IID	0,735	0,667	
	A0A0E2V6Z6	PTS sugar transporter subunit IIA	0,792	0,786	
	A0NL44	Predicted nucleic-acid-binding protein implicated in transcription termination	0,610	0,717	
	A0A0E2X9X5	ABC transporter permease	0,755	0,598	
	D3L7V5	ArsR family transcriptional regulator	0,642	0,682	
	A0A0E2X8R3	Amino acid ABC transporter substrate- binding protein	0,720	0,604	
	A0NL74	PTS system, IIA component	0,731	0,745	
	D3L964	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	0,773	0,8	
	A0NI06	Sugar ABC transporter, permease protein	0,791	0,582	
	A0A0E2V6P6	Acetyltransferase	0,683	0,769	
	A0A0E2V8C7	Septum formation inhibitor MinC	0,573	0,515	
	A0NHI6	Transcriptional regulator, MarR family	0,644	0,743	

Protéines sur-exprimées communes à l'ensemble des conditions de pH et celles communes des conditions de pH les plus acides (pH 2,8 et pH 3)

	N° accession	Description	Ratio pH2,8/ pH4	Ratio pH3/ pH4	Ratio pH3,3/ pH4
Protéines communes aux conditions pH 2,8 ; 3 ; 3,3	A0NKY4	Histidine kinase	1,938	1,279	1,204
	D3LB61	malate perméase	1,366	1,447	1,216
	A0NLA2	Phosphoribosyltransferase	1,672	1,354	1,271
	A0A0E2XA89	General stress protein	1,551	1,260	1,325
	D3L780	arabinose proton symporter	1,916	1,620	1,637
	A0NHP3	Uncharacterized protein	1,703	1,316	1,224
	D3LBI9	Uncharacterized protein	1,224	1,322	1,224
	D3L7Y9	Uncharacterized protein	1,684	1,465	1,416
	D3L985	Argininosuccinate synthase	1,284	2,32	1,373
	A0NL30	Acyl carrier protein	1,273	1,993	1,642
	A0NIS2	Aldo/keto réductase	1,367	1,219	1,204
	A0A0E2VB45	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	1,429	1,318	1,223
	A0NKW5	Pyruvate oxidase	1,495	1,322	1,221
	A0A0E2V747	Protein MraZ	1,625	1,415	1,248
Protéines communes aux conditions pH 2,8 et 3	A8DPT7	OptS	1,353	1,320	
	A0NKP7	D-lactate dehydrogenase 2	1,567	1,215	
	A0NHY8	Amino acid permease	1,225	1,291	
	A0NKX9	Assimilatory nitrite reductase, subunit	1,272	1,308	
	A0NKH2	Fructosamine-3-kinase	1,206	1,243	
	A0NJU2	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	1,43	1,329	
	D3L987	Uncharacterized protein	1,371	1,339	
	D3L8C8	ATP synthase subunit a	1,209	1,396	
	A0NLC6	2-succinylbenzoate--CoA ligase	1,23	1,260	
	A0NLB5	Galactose permease	1,223	1,231	
	A0NII6	L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	1,205	1,23	
	A0A0E2V860	Oxidoreductase	1,853	1,239	
	A0A0E2V687	ATP synthase F0F1 subunit gamma	1,239	1,216	
	A0NKS3	Transcriptional regulator, LytR family	1,216	1,265	
	A0A0E2V662	Glutathione réductase	1,260	1,205	
	A0A0E2X8I0	Aldo/keto réductase	1,998	1,284	
	A0NKI3	Aspartokinase	1,202	1,369	
	A0NLB8	Aldose 1-epimerase	1,434	1,348	
	A0A0E2XRX3	NUDIX hydrolase	1,248	1,390	
	D3LC38	Low temperature requirement C protein	1,467	1,367	
	A0NI35	Aldo/keto reductase, diketogulonate reductase	1,239	1,301	
	D3L8Q9	Uncharacterized protein	1,336	1,224	
	A0NJV2	Tributylin esterase	1,578	1,319	
	D3L8X3	HMP-PP hydrolase (pyridoxal phosphatase) Cof, detected in genetic screen for thiamin metabolic genes	1,244	1,397	
	A0NKJ4	Lipoate--protein ligase	1,285	1,203	
	A0NHM3	Quinone oxidoreductase	1,262	1,491	
	A0NL37	ABC transporter, ATP-binding protein	1,362	1,220	
	A0NKV5	L-asparaginase	1,291	1,224	
	D3L6Y8	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	1,201	1,310	

A0NKR8	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,260	1,353
A0NHJ6	ATP synthase subunit alpha	1,219	1,256
Q04FS3	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	1,713	1,221
A0NKQ2	ABC transporter, ATP-binding protein	1,254	1,393
D3L9I0	Uncharacterized protein	1,436	1,565
A0NJL7	NADPH-quinone oxidoreductase, Zn-dependent	1,370	1,405

Annexe 3 : Ensemble des protéines ayant un changement d'expression significatif dans l'EP n° 2.

Protéines sous-exprimées (ratio inférieur à 0,8 et p value<0,05)

N° accession	Description	Ratio pH3,3/ pH4	p-value
Q04G81	30S ribosomal protein S19	0,423	0,001
A0NI20	Acyl carrier protein	0,492	0,033
Q04HJ7	Uncharacterized protein	0,497	0,032
Q04HG7	Uncharacterized protein	0,498	0,022
Q04DC1	Methylmalonyl-CoA epimerase	0,569	0,012
A0A0E2XRY1	Alcohol dehydrogenase	0,590	0,000
Q04FP8	30S ribosomal protein S16	0,596	0,000
Q04EG5	30S ribosomal protein S20	0,609	0,025
Q04HQ3	50S ribosomal protein L9	0,610	0,002
Q04G74	50S ribosomal protein L24	0,627	0,030
A0NJA9	Histone-like DNA-binding protein	0,628	0,024
A0A0E2X929	Uracil phosphoribosyltransferase	0,643	0,001
Q04G69	30S ribosomal protein S5	0,645	0,024
A0A0E2X9W2	Acetyl-CoA carboxylase	0,664	0,010
A0A0E2VQQ8	Uncharacterized protein	0,668	0,046
D3LA90	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase SV=1	0,679	0,007
Q8VW55	Ornithine carbamoyltransferase, catabolic	0,689	0,009
Q04GF3	NUDIX family hydrolase	0,690	0,000
A0NKR8	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,700	0,026
D3L6Q5	oxydo réductase activity	0,700	0,009
D3LB86	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	0,701	0,046
Q04G85	50S ribosomal protein L3	0,704	0,033
A0NJL0	Proline iminopeptidase	0,719	0,023
A0A0E2X9F2	Fructokinase	0,723	0,007
A0A0E2VCC5	50S ribosomal protein L18	0,736	0,026
Q04G86	30S ribosomal protein S10	0,737	0,024
Q04G80	50S ribosomal protein L22	0,738	0,002
Q04HJ3	2,3 butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (S)-acetoïn-specific	0,740	0,023
Q04GA4	Phosphoglycerate dehydrogenase related enzyme	0,742	0,018
A0A0E2V6X0	Phosphoglycerate kinase	0,745	0,044
D3LBY2	aldehyde lyase activity	0,749	0,001
D3LB91	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase, FabK	0,754	0,030
Q04G83	50S ribosomal protein L23	0,765	0,002
A0NL60	D-lactate dehydrogenase	0,775	0,010
D3L7H6	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	0,778	0,045
Q04GA1	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB	0,783	0,001
Q04EV0	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	0,788	0,004
A0NIH5	DnaJ-class molecular chaperone, Zn finger domain	0,789	0,011
Q04ED5	30S ribosomal protein S7	0,796	0,027
D3LA88	tRNA binding	0,798	0,012
A0A0E2X934	Sigma-54 modulation protein	0,798	0,000
A0A0E2X7R4	Pyruvate oxidase	0,801	0,047

D3LBG1	integral component of the membrane	0,802	0,012
---------------	------------------------------------	-------	-------

Protéines sur-exprimées (ratio supérieur à 1,2 et p value<0,05)

N° accession	Description	Ratio pH3,3/ pH4	p-value
A0NH10	Transcription termination/antitermination protein NusG	1,203	0,001
D3L9D8	Glycine--tRNA ligase alpha subunit	1,204	0,011
Q04DA0	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	1,205	0,022
A0A0E2V988	Cell division protein FtsY	1,206	0,030
A0A0E2XQL3	Translation initiation factor 3	1,207	0,012
D3L9R6	Uncharacterized protein	1,208	0,036
Q04F87	Elongation factor Ts	1,209	0,042
A0NIB5	Cmp-binding-factor 1	1,211	0,002
A0NJ16	L-itol 2-dehydrogenase	1,212	0,000
D3L6M3	Uncharacterized protein	1,214	0,011
A0A0E2V6N7	Inorganic pyrophosphatase	1,214	0,013
D3LBU2	Uncharacterized protein	1,218	0,023
Q04GG2	Aryl-alcohol dehydrogenase related enzyme	1,221	0,011
A0A0E2XQK7	Diadenosine tetraphosphate hydrolase	1,222	0,047
Q04HE1	Hemolysin-like protein containing CBS domains	1,226	0,001
Q04GS7	Phosphotransferase system, mannose specific component IIB	1,228	0,001
Q04F88	30S ribosomal protein S2	1,234	0,004
A0A0E2X889	Elongation factor P	1,236	0,019
Q04DV8	Tyrosine-protein kinase (Capsular polysaccharide biosynthesis)	1,237	0,031
A0A0E2V984	Phosphate acyltransferase	1,237	0,023
A0A0E2XRS0	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein	1,242	0,033
A0NL49	DNA helicase	1,243	0,020
D3L950	Uncharacterized protein	1,243	0,041
A0NIZ5	Exodeoxyribonuclease 7 small subunit	1,247	0,008
Q04G36	Glucosamine-6-phosphate deaminase	1,248	0,021
A0NJT1	Ser/Thr protein kinase	1,248	0,022
A0NL16	Chromosomal replication initiator protein DnaA	1,248	0,016
D3L946	Arginine--tRNA ligase	1,249	0,045
A0NJD6	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase 2	1,253	0,000
A0A0E2VCH9	Oxidoreductase	1,254	0,007
A0A0E2X8A8	Peptide chain release factor 3	1,254	0,020
D3L8E1	Uncharacterized protein	1,256	0,027
D3L6X0	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	1,256	0,001
D3L7E1	Integral component of membrane	1,257	0,030
Q04GC1	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein, PhoT family	1,258	0,040
D3LBD0	Polyphosphate kinase	1,260	0,043
D3L9E4	Peptidase T	1,260	0,007
A0A0E2V7M5	Transcriptional regulator	1,262	0,014
A0NKI4	Threonine synthase	1,264	0,034
A0A0E2V8C5	Integral component of membrane	1,267	0,043
Q04G77	50S ribosomal protein L29	1,268	0,037
D3L890	30S ribosomal protein S11	1,269	0,019
A0A0E2XR12	Uncharacterized protein	1,270	0,008
D3L9L6	Integral component of membrane	1,272	0,003
A0A0E2X8F1	Glycosyl transferase family 1	1,273	0,013

A0A0E2V7H6	DNA polymerase III	1,274	0,025
D3L821	L lactate dehydrogenase	1,274	0,025
A0NIF8	Nucleotide pyrophosphatase	1,275	0,014
A0A0E2VBU7	LacI family transcriptional regulator	1,278	0,004
D3L9Q6	Asparagine--tRNA ligase	1,279	0,035
D3L7R4	ATP binding / nucleoside kinase activity	1,281	0,000
D3L6P1	Multiple sugar ABC transporter	1,283	0,028
A0A0E2VR70	Theronine dehydrogenase	1,284	0,020
A0A0E2V835	Peptide chain release factor 2	1,285	0,012
D3L9I2	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	1,291	0,010
A0NJJ4	Phosphate import ATP-binding protein PstB	1,292	0,001
Q04G72	30S ribosomal protein S8	1,297	0,010
A0A0E2X8G0	Esterase	1,298	0,037
A0NJ68	Dolichol phosphate mannose synthase	1,299	0,003
Q04G82	50S ribosomal protein L2	1,307	0,028
Q04F86	Uridylate kinase	1,307	0,014
Q04GD9	GMP réductase	1,309	0,004
A0A0E2XFE5	Exodeoxyribonuclease	1,310	0,028
D3L736	hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity	1,310	0,005
D3LAW5	glycerate kinase activity	1,311	0,003
Q04G12	DNA polymerase I	1,312	0,022
D3LBV3	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1,312	0,031
A0A0E2V817	NAD(P) transhydrogenase subunit beta	1,318	0,041
D3L949	Hydrolase activity	1,320	0,013
D3L9Y8	lipid biosynthetic process	1,321	0,027
A0A0E2VBU3	Hydrocarbon-binding protein	1,322	0,005
D3L7Y1	ATP binding	1,327	0,014
A0NIM5	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase	1,331	0,015
D3L9K3	Catalytic activity / metabolic process	1,333	0,005
D3LB47	Ribonuclease M5	1,336	0,023
Q04D36	NAD-dependent protein deacetylase, SIR2 family	1,336	0,003
Q04ER1	Putative Holliday junction resolvase	1,340	0,001
A0A0E2V7N0	GTP-binding protein TypA	1,341	0,001
A0A0E2XQI1	Transcription termination factor NusB	1,343	0,002
Q04DG5	Sodium/proton antiporter, CPA1 family	1,344	0,008
A0A0E2X8W4	Uncharacterized protein	1,347	0,004
D3L861	aminoacyl-tRNA ligase activity/ATP binding	1,347	0,007
Q04G53	Uncharacterized protein	1,347	0,033
A0A0E2X997	Alanine racemase	1,357	0,001
Q04GP1	Citrate lyase beta subunit	1,363	0,000
Q04GN3	Transcription termination/antitermination protein NusA	1,363	0,001
A0A0E2V6W7	UDP pyrophosphate synthase	1,363	0,006
A0NHI5	rRNA methylase	1,364	0,006
D3L9Y0	Alanine--tRNA ligase	1,367	0,004
D3L739	Lysine--tRNA ligase	1,368	0,004
A0A0E2VNX9	Kinase	1,369	0,038
A0A0E2V720	Fe-S cluster assembly protein SufB	1,371	0,012
Q04G60	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1,375	0,011
A0NJS8	Elongation factor Tu	1,376	0,011
Q04EG8	BS_ysoA related protein with TPR repeats	1,377	0,006
Q04FS1	4-hydroxy-tetrahydronicotinate synthase	1,377	0,000
D3LB50	oxidoreductase activity	1,380	0,001
Q04F46	UPF0346 protein OE0E_1017	1,382	0,012

Q04E44	50S ribosomal protein L10	1,384	0,003
Q04DA8	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like deacylase	1,389	0,001
Q04F45	Ribosome biogenesis GTPase A	1,389	0,023
D3L703	hydrolase activity, hydrolyzing N-glycosyl compounds	1,389	0,019
A0A0E2V600	Peptidase M20	1,393	0,003
A0NIU8	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	1,394	0,002
A0A0E2XQX1	Phosphomethylpyrimidine kinase	1,396	0,002
A0NJZ6	Adenine deaminase	1,401	0,005
A0NKG0	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA ^{Gln} amidotransferase, A subunit	1,402	0,000
D3LAN8	Uncharacterized protein	1,403	0,001
A0NJ98	Uncharacterized protein	1,404	0,003
A0A0E2VC83	Thioredoxin réductase	1,408	0,011
A0A0E2V739	Cell division protein SepF	1,409	0,004
D3L9V9	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	1,409	0,014
A0A0E2V7T6	D-alanine--D-alanine ligase	1,414	0,001
A0NJJ8	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	1,439	0,049
A0NL32	Phosphatase	1,440	0,011
D3LAI3	oxidoreductase activity/zinc ion binding	1,440	0,021
Q04DA9	Methionine synthase II (Cobalamin-independent)	1,441	0,000
A0A0E2VPJ8	Prolyl-tRNA synthetase	1,443	0,016
Q04E42	50S ribosomal protein L11	1,444	0,003
Q04G75	50S ribosomal protein L14	1,446	0,008
Q04F34	50S ribosomal protein L33	1,447	0,005
D3L9T5	Adenylosuccinate lyase	1,448	0,002
Q04G23	ATP synthase subunit delta	1,448	0,001
A0NIW7	Integral component of membrane	1,449	0,001
A0NII3	Protein translocase subunit SecA	1,452	0,009
Q04D49	50S ribosomal protein L31 type B	1,458	0,006
A0NIC0	Uncharacterized protein	1,463	0,000
A0NIH3	Peptidase, S9 family	1,468	0,016
D3L852	Elongation factor 4	1,470	0,035
D3L957	Ribosomal silencing factor RsfS	1,473	0,001
A0A0E2V703	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	1,477	0,001
Q04FA7	Uncharacterized protein	1,479	0,001
A0A0E2V745	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	1,482	0,002
A0A0E2V6V5	X-Pro aminopeptidase	1,483	0,001
D3LAG1	PTS system, trehalose-specific IIA component	1,489	0,002
A0NJV5	Oxidoreductase	1,493	0,015
A0A0E2V687	ATP synthase F0F1 subunit gamma	1,494	0,003
A0NJU0	Serine hydroxymethyltransferase	1,496	0,000
D3L982	Thiamine pyrophosphate	1,502	0,024
A0NK16	Nicotinate phosphoribosyltransferase	1,502	0,042
Q04HJ8	Exopolysaccharide biosynthesis protein	1,506	0,000
A0NJR2	Ribonuclease R	1,515	0,005
Q04GN0	Translation initiation factor IF-2	1,516	0,009
D3L8Y5	ATPase activity/ATP binding	1,520	0,002
Q04G65	Adenylate kinase	1,522	0,002
Q04GN4	Ribosome maturation factor RimP	1,522	0,005
A0NHL3	Dipeptidase 1, peptidase M20 family	1,523	0,002
A0A0E2X8R9	Phosphate acetyltransferase	1,524	0,009
A0A0E2VQU0	Alanine-phosphoribitol ligase	1,530	0,008

A0NIV8	Ribonuclease J	1,547	0,009
Q04FL3	S-adenosylmethionine synthase	1,550	0,000
Q04D54	Sucrose phosphorylase	1,551	0,003
A0A0E2V5P2	Oligopeptidase PepB	1,553	0,001
A0NHK4	ABC-type oligopeptide transport system, ATP-binding cassette	1,565	0,001
A0NHW1	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	1,568	0,005
A0NIZ2	Alkaline-shock protein	1,578	0,003
A0A0E2VB96	Uncharacterized protein	1,602	0,019
A0NKH4	ABC transporter, ATPase	1,605	0,000
D3LA68	Acetate kinase	1,607	0,006
Q04ED6	Elongation factor G	1,615	0,000
D3L8D4	ATP synthase subunit beta	1,619	0,006
A0NKM4	Transcriptional regulator MraZ	1,632	0,004
A0A0E2VBT0	ATP F0F1 synthase subunit alpha	1,652	0,001
A0A0E2VBK2	Aromatic amino acid aminotransferase	1,660	0,003
D3LAJ7	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	1,664	0,001
D3L6W6	Integral component of membrane	1,666	0,002
D3LBH4	Uncharacterized protein	1,669	0,000
D3L937	Nicotinate phosphoribosyltransferase	1,683	0,000
A0A0E2V731	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	1,699	0,000
D3LBE3	ATP binding/helicase	1,700	0,009
A8DPU2	Peptide ABC transporter ATP-binding protein OptD	1,725	0,008
A0A0E2X8K6	Ribonuclease J	1,727	0,000
Q04HQ7	30S ribosomal protein S6	1,750	0,000
A0NLC5	Oligoendopeptidase F, peptidase M3 family	1,757	0,000
A0NHJ8	ATP synthase subunit b	1,760	0,004
A0A0E2V613	NADH-flavin reductase	1,789	0,003
D3LB45	Uncharacterized protein	1,826	0,001
A0A0E2XQC8	Cysteine synthase	1,855	0,005
A0NK94	stress reponse protein csbd	1,886	0,003
A0NIS1	Dinucleotide-binding protein	1,908	0,001
A0NIY5	Transcription elongation factor GreA	1,939	0,000
A0NK54	30S ribosomal protein S18	1,988	0,002
Q04GB4	HPr kinase/phosphorylase	2,013	0,000
A0NJJ5	Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	2,056	0,001
A0A0E2V5S8	NADPH-dependent FMN reductase	2,329	0,013
A0A0E2V624	Transcriptional regulator	2,338	0,005
Q04G25	ATP synthase subunit c	2,572	0,003
D3LBR9	Pyridoxal 5'-phosphate cofactor	2,649	0,003
Q04DQ5	S-ribosylhomocysteine lyase, LuxS	2,655	0,002
A0NI56	Fructose-bisphosphate aldolase	2,818	0,012
D3L9S9	purine nucleobase transmembrane transporter activity	2,960	0,007
Q04D39	Universal stress protein UspA-like nucleotide-binding protein	3,352	0,014

Annexe 4 : Ensemble des protéines sous et sur-exprimées significatives identifiées lors de l'EP n° 4 pour la modalité 1 g/L d'extrait polyphénolique T3.

Protéines sous-exprimées (ratio inférieur à 0,8 et p value<0,05)

N° accession	Description	Ratio	p-value
G9WFD8	Peptide chain release factor 2	0,130	0,000
D3LAX2	Uncharacterized protein	0,205	0,018
D3LBC9	Uncharacterized protein	0,208	0,039
Q04D82	Methionine--tRNA ligase	0,211	0,008
Q04DX8	Uncharacterized protein	0,221	0,037
Q04DL2	Nucleoside ABC transporter membrane protein	0,235	0,021
Q04CZ8	Aggregation promoting factor related surface protein	0,243	0,034
A0NHR4	Peptidoglycan binding protein ; Muramidase with LysM repeats	0,248	0,016
Q04DS9	Permease of the major facilitator superfamily	0,263	0,021
Q04F93	LexA repressor	0,293	0,031
D3LBG1	Uncharacterized protein	0,302	0,011
Q04G15	Cell division membrane protein	0,305	0,024
D3L9Q4	Uncharacterized protein	0,315	0,003
Q04G47	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	0,353	0,006
D3L9G2	Uncharacterized protein	0,362	0,001
Q04H33	Uncharacterized protein	0,369	0,049
D3LAR5	Uncharacterized protein	0,385	0,023
Q04E99	Uncharacterized protein	0,402	0,013
D3L7V3	Sugar transport protein	0,405	0,004
Q04DT9	Uncharacterized protein	0,409	0,048
D3LBB7	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, periplasmic component	0,428	0,014
Q04FB8	Uncharacterized protein	0,455	0,020
Q04F91	Uncharacterized protein	0,457	0,014
Q04DI6	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	0,467	0,047
Q04HF7	Signal transduction histidine kinase	0,493	0,028
Q04DH5	Cation transport ATPase	0,504	0,036
Q04FY8	Alpha/beta superfamily hydrolase	0,507	0,021
Q04EB2	PTS system IIB component, Glc family / PTS system IIC component, Glc family / PTS system IIA	0,519	0,027
Q04ES2	DNA segregation ATPase FtsK	0,522	0,038
A0A1S2S1H1	Cell division protein FtsI	0,524	0,000
D3L7U9	Uncharacterized protein	0,526	0,029
Q04EP5	Xylulose-5-phosphate phosphoketolase/fructos-6-phosphate phosphoketolase	0,529	0,000
Q04FC0	Argininosuccinate synthase	0,531	0,001
D3LAC4	Uncharacterized protein	0,536	0,017
D3LBQ6	Undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase	0,537	0,015
Q04DU0	DNA replication initiation protein	0,540	0,003
Q04E93	Cation transport ATPase	0,540	0,008
A0A1S2S0X2	Uncharacterized protein	0,546	0,028
Q04HA8	Uncharacterized protein	0,547	0,028
Q04F42	DNA topoisomerase 1	0,554	0,011
Q04HF9	Integral membrane protein	0,557	0,002
D3LC95	Uncharacterized protein	0,560	0,004
D3L7G1	ATP-dependent helicase/nuclease subunit A	0,561	0,003
Q04GS7	PTS system, mannose-specific component IIB	0,562	0,005

Q8RTF6	ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	0,565	0,002
D3LB10	Uncharacterized protein	0,566	0,020
Q04G29	Phosphoglycerol transferase-like protein, alkaline phosphatase superfamily	0,568	0,046
Q04FE4	SAM-dependent methyltransferase	0,580	0,018
Q04G40	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	0,581	0,004
D3L8H6	Uncharacterized protein	0,583	0,043
Q04H99	Predicted membrane protein	0,584	0,029
A0A1S2S402	dITP/XTP pyrophosphatase	0,585	0,024
Q04G82	50S ribosomal protein L2	0,588	0,001
Q04HG8	Predicted membrane protein	0,589	0,002
Q3MUA6	Malolactic regulator	0,593	0,000
Q04ER8	Pseudouridine synthase	0,593	0,041
D3L7T0	Chromosome partition protein Smc	0,594	0,035
Q04H93	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	0,594	0,041
Q04DN7	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	0,597	0,028
Q04DN2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2, FabF	0,598	0,012
D3LCR0	Uncharacterized protein	0,603	0,017
D3L926	tRNA-dependent lipid II-Ala--L-alanine ligase, MurM	0,605	0,049
Q04F80	DNA polymerase III PolC-type	0,610	0,024
Q04EH2	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	0,612	0,005
Q04DN6	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	0,612	0,017
D3LB85	Biotin carboxylase	0,637	0,010
D3L9V5	Cell division protein SepF	0,638	0,044
D3L7T7	Threonine--tRNA ligase	0,641	0,000
Q04F51	CCA-adding enzyme	0,652	0,034
D3L7D8	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1, DltA	0,652	0,002
D3L779	L-arabinose isomerase	0,652	0,003
Q8RTF7	ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	0,653	0,003
Q04E77	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	0,656	0,027
Q4A3D4	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain	0,657	0,005
Q04G10	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	0,658	0,047
Q04ES8	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	0,662	0,047
Q04F63	DNA-directed DNA polymerase	0,663	0,022
D3LC13	NADH dehydrogenase	0,664	0,003
Q04GQ3	Uncharacterized protein	0,664	0,016
Q04FF2	DNA repair ATPase	0,669	0,011
Q04G33	1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase	0,671	0,030
Q04ED4	30S ribosomal protein S12	0,676	0,007
Q04F36	DNA topoisomerase 4 subunit A	0,679	0,006
A0A1S2S2L1	GNAT family N-acetyltransferase	0,680	0,020
Q04E22	Ribonuclease R	0,681	0,002
D3L9R5	ATP-dependent RecD-like DNA helicase	0,683	0,008
Q04FP0	Stress response membrane GTPase	0,690	0,001
D3LAF9	Trehalose-6-phosphate hydrolase	0,691	0,005
Q04DZ3	ADP-ribosylglycohydrolase	0,698	0,027
D3LB86	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	0,701	0,000
Q04EY1	Oligopeptidase F	0,706	0,011
D3L7J7	UvrABC system protein B	0,708	0,028
Q04FL2	Leucine--tRNA ligase	0,709	0,049
Q04ES5	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	0,709	0,039

Q04DM5	3-hydroxymyristoyl/3-hydroxydecanoyl-(Acyl carrier protein) dehydratase	0,713	0,047
Q04HH0	Trypsin-like serine protease with PDZ domain	0,714	0,036
Q04DF5	Transcriptional regulator, LacI family	0,718	0,030
Q04GA4	Phosphoglycerate dehydrogenase related enzyme	0,719	0,002
Q04FG4	Nucleotide deoxyribosyltransferase	0,720	0,042
D3L9Q6	Asparagine--tRNA ligase	0,722	0,002
Q04E76	Xre-like DNA-binding protein	0,723	0,049
Q04D36	NAD-dependent protein deacetylase, SIR2 family	0,726	0,003
Q04ER9	6-phosphogluconolactonase	0,727	0,013
D3LB91	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase, FabK	0,731	0,001
Q04EG1	Protein translocase subunit YajC	0,736	0,014
D3L9M9	GTPase Obg	0,737	0,025
D3LAP8	Arginine--tRNA ligase	0,737	0,027
Q04DN0	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase FabD	0,739	0,000
D3LAS9	Uncharacterized protein	0,743	0,028
Q04E66	30S ribosomal protein S4	0,745	0,013
D3L8E3	DNA polymerase I	0,747	0,009
Q04E14	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	0,747	0,026
Q04GN7	ATP dependent DNA helicase UvrD	0,750	0,024
D3LB89	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] réductase, FabG	0,752	0,006
D3LAS1	Uracil-DNA glycosylase	0,755	0,006
D3L9L4	Aminopeptidase	0,756	0,003
Q04GN1	LSU ribosomal protein L7AE	0,757	0,034
D3L9V2	Isoleucine--tRNA ligase	0,762	0,021
Q04DM7	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3, FabH	0,762	0,048
Q04H47	Proline iminopeptidase	0,762	0,014
D3LA17	Exopolysaccharide biosynthesis protein	0,763	0,025
D3LAL6	Septation ring formation regulator EzrA	0,764	0,008
D3LBY5	Tyrosine--tRNA ligase	0,766	0,050
Q04ED0	Protein translocase subunit SecA	0,770	0,030
Q04EP6	D-lactate dehydrogenase	0,770	0,025
D3LA87	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	0,774	0,000
Q04F81	Proline--tRNA ligase	0,783	0,002
D3LAN3	DNA polymerase III, subunit gamma and tau	0,784	0,027
Q04DP0	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	0,789	0,028
D3L847	Proline iminopeptidase	0,792	0,014
D3L7J9	UvrABC system protein A	0,796	0,016
D3LA85	Peptide chain release factor 3	0,798	0,048
Q04FG0	Aminotransferase	0,798	0,017
Q04E86	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	0,798	0,005

Protéines sur-exprimées (ratio supérieur à 1,2 et p value<0,05)

N° accession	Description	Ratio	p-value
Q04HD6	DNA-binding response regulator, OmpR family (Rec-wHTH domains)	1,202	0,003
Q04ER1	Putative pre-16S rRNA nuclease	1,220	0,010
Q04H13	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase	1,227	0,019
Q04G13	D-alanine--D-alanine ligase, Ddl	1,249	0,018
D3L921	Transcriptional regulator, MerR family	1,250	0,027
Q04G23	ATP synthase subunit delta	1,262	0,029
Q4A3D3	10 kDa chaperonin	1,269	0,012
D3L834	HPr kinase/phosphorylase	1,273	0,049
Q04GP2	Citrate lyase acyl carrier protein	1,281	0,025
Q04G36	Glucosamine-6-phosphate deaminase	1,284	0,047
A0A0A0M157	Probable nicotinate-nucleotide adenylyltransferase	1,298	0,002
Q04DF2	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	1,301	0,002
D3L943	Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase, NadR / Ribosylnicotinamide kinase	1,305	0,001
D3LBB3	Ribose-5-phosphate isomerase A	1,311	0,033
Q04D26	Asparaginase	1,337	0,034
Q04D39	Universal stress protein UspA-like nucleotide-binding protein	1,349	0,008
Q04HJ2	Short chain dehydrogenase	1,354	0,017
D3L7Z4	Alcohol dehydrogenase I	1,363	0,036
Q04CY3	Aromatic compounds catabolism protein	1,389	0,011
Q04FZ5	Uncharacterized protein	1,396	0,013
D3LC81	Uncharacterized protein	1,408	0,047
Q04EQ7	Hypothetical universel stress protein	1,413	0,042
G9WFZ4	Uncharacterized protein	1,422	0,045
Q04G02	Uncharacterized protein	1,424	0,004
Q04F11	Uncharacterized protein encoded in hypervariable junctions of pilus gene clusters	1,424	0,040
Q04HJ3	2,3 butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (S)-acetoïn-specific	1,432	0,009
Q04FE0	rRNA methylase	1,439	0,005
Q04HR5	DNA polymerase III subunit beta	1,454	0,003
Q04FB2	Gamma-glutamyl phosphate réductase	1,454	0,016
A0A0A0M2W9	Molecular chaperone DnaK	1,498	0,044
Q04EU7	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	1,513	0,010
Q04EV9	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC	1,529	0,045
D3LAF1	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	1,530	0,014
D3LCI5	Prophage Lp2 peotein 18	1,539	0,040
D3L792	glucose-1-dehydrogenase	1,548	0,022
D3LC83	Uncharacterized protein	1,549	0,045
Q04HE0	Ribonucleotide reduction protein	1,551	0,012
Q04DC8	ADP-ribose pyrophosphatase	1,584	0,027
Q04DC4	Thioredoxin	1,610	0,027
K7XJW4	Uncharacterized protein	1,612	0,049
Q04F07	Dipeptidase	1,647	0,008
D3LCF0	Uncharacterized protein	1,671	0,049
Q04GB1	Thioredoxin réductase	1,674	0,005
D3LAM1	Redox-sensing transcriptional repressor Rex	1,678	0,017
Q04GX4	Predicted phosphoribosyltransferse	1,800	0,002
Q04G25	ATP synthase subunit c	1,805	0,045
D3LC52	Uncharacterized protein	1,869	0,003

D3LC87	Uncharacterized protein	1,925	0,005
Q04FS1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	1,950	0,016
Q04DF0	Inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	1,967	0,001
A0A1S2S032	MerR family transcriptional regulator	2,015	0,050
Q04HC3	NAD(P)H-hydrate epimerase	2,052	0,007
D3LC78	Uncharacterized protein	2,069	0,004
Q04FZ3	Diacetyl réductase	2,278	0,002
D3L7N5	Oxidoreductase	2,443	0,014
Q04HG9	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	2,609	0,015
D3LC59	Uncharacterized protein	2,616	0,003
Q04E35	Mini-ribonuclease 3	2,684	0,044
D3LAD8	Uncharacterized protein	2,871	0,000
D3LC72	Uncharacterized protein	2,934	0,009
Q04EZ4	Transcriptional regulator	3,778	0,005
G9WH65	Uridylate kinase	4,786	0,033
G9WF65	SufC-like iron-sulfur cluster assembly ATPase protein	24,353	0,004

Annexe 5 : Ensemble des protéines sous et sur-exprimées significatives identifiées lors de l'EP n° 4 pour la modalité 2,5 g/L d'extrait polyphénolique T3.

Protéines sous-exprimées (ratio inférieur à 0,8 et p value<0,05)

N° accession	Description	Ratio	p-value
Q04GY1	Uncharacterized protein	0,047	0,023
G9WFD8	Peptide chain release factor 2	0,047	0,000
Q04E99	Uncharacterized protein	0,054	0,011
Q04D82	Methionine--tRNA ligase	0,068	0,004
Q04FB8	Uncharacterized protein	0,077	0,003
D3LA14	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor	0,078	0,011
D3LAX2	Uncharacterized protein	0,082	0,027
D3LC14	Aggregation promoting factor related surface protein	0,088	0,024
D3L909	Uncharacterized protein	0,093	0,037
Q04HB4	Phosphoglycerol transferase-like protein, alkaline phosphatase superfamily	0,099	0,022
Q04DX8	Uncharacterized protein	0,104	0,029
D3L754	Uncharacterized protein	0,106	0,050
A0A1S2S0X2	Uncharacterized protein	0,108	0,001
Q04DL2	Nucleoside ABC transporter membrane protein	0,130	0,031
A0A1S2S4M8	Integral membrane protein	0,142	0,039
Q04G64	Translation initiation factor IF-1	0,146	0,048
Q04D00	Cytochrome bd quinol oxidase subunit 1 apoprotein	0,155	0,032
G9WHV3	Xylulose-5-phosphate phosphoketolase	0,168	0,029
D3LBB7	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, periplasmic component	0,178	0,010
D3L8T8	L-alanyl-gamma-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase	0,183	0,041
D3L8H6	Uncharacterized protein	0,186	0,008
Q04DX3	Uncharacterized protein	0,186	0,029
Q04G47	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	0,186	0,002
D3LBG1	Uncharacterized protein	0,193	0,006
Q04F50	Dihydrofolate réductase	0,200	0,015
Q04HD9	Ribonucleoside-diphosphate reductase class Ib glutaredoxin subunit	0,211	0,008
D3LAR5	Cell wall-associated hydrolase with LysM domains	0,218	0,013
Q4A3D4	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain	0,229	0,002
Q04F82	Zinc metalloprotease	0,231	0,047
D9J2Q2	Alpha-L-arabinofuranosidase	0,233	0,022
Q04GS5	PTS system IID component, Man family	0,243	0,000
D3LBC0	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	0,249	0,004
Q04D28	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	0,252	0,000
D3L9Q4	Carboxypeptidase	0,258	0,000
Q04DI6	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	0,263	0,008
Q04H52	PTS system IIB component, Gat family	0,264	0,021
A0A1S2S2L1	Acetyltransferase	0,269	0,003
D3L6N6	Uncharacterized protein	0,277	0,022
Q04G32	Glycosyltransferase	0,278	0,049
Q04FY8	Alpha/beta superfamily hydrolase	0,281	0,006
D3LB85	Biotin carboxylase	0,282	0,004
Q04DN7	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha	0,285	0,007

Q04G40	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	0,292	0,000
D3LAI7	Uncharacterized protein	0,304	0,004
A0A1S2S402	dITP/XTP pyrophosphatase	0,305	0,005
D3L779	L-arabinose isomerase	0,309	0,000
Q04HF9	Integral membrane protein	0,319	0,013
Q04F93	LexA repressor	0,322	0,017
Q04DN2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2, FabF	0,325	0,008
D3LBD8	Amino acid permease	0,327	0,041
Q04EZ1	Pseudouridine synthase	0,332	0,004
Q04GC0	Phosphate transport system permease protein	0,337	0,046
Q04FP7	Methylated DNA-protein cysteine methyltransferase	0,349	0,012
Q04F68	DNA primase	0,357	0,026
A0NJ81	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	0,358	0,050
Q04FA9	Glutamine synthetase repressor	0,360	0,024
Q04GS6	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC	0,363	0,038
D3LB91	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase FabK	0,374	0,000
Q04DC9	Uncharacterized domain/protein associated with RNase G and E	0,380	0,030
D3LA90	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	0,383	0,037
Q04DN6	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	0,389	0,002
D3L9V5	Cell division protein SepF	0,391	0,038
Q04FB6	Uncharacterized protein	0,391	0,037
Q04G82	50S ribosomal protein L2	0,392	0,009
Q04EL2	DNA repair protein RecN	0,395	0,040
Q04DK1	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component OppD	0,396	0,015
Q04DM5	3-hydroxymyristoyl/3-hydroxydecanoyl-(Acyl carrier protein) dehydratase	0,402	0,010
Q04FH7	Permease of the major facilitator superfamily	0,407	0,027
A0A1S2S1H1	Cell division protein FtsI	0,408	0,000
Q04ER8	Pseudouridine synthase	0,412	0,019
D3L8E0	Cell division membrane protein	0,412	0,046
D3L7D8	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	0,414	0,000
D3L7T1	Uncharacterized protein	0,417	0,039
D3LB89	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] réductase, FabG	0,431	0,000
D3L9M7	Exonuclease RecJ	0,432	0,022
Q04DN0	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase, FabD	0,433	0,000
Q04E93	Cation transport ATPase	0,440	0,001
D3LAR9	Lactoylglutathione lyase	0,440	0,030
Q04EB2	PTS system, trehalose specific IIB, IIC component	0,441	0,012
D3LBA9	Putative deoxyribose-specific ABC transporter, ATP-binding protein	0,442	0,020
G9WF14	Replicative DNA helicase	0,444	0,044
Q04G37	Phosphotransferase system, HPr-related protein	0,449	0,041
Q04EP5	Xylulose-5-phosphate phosphoketolase/fructose-6-phosphate phosphoketolase	0,450	0,000
D3LB86	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	0,450	0,000
Q04FR5	Uncharacterized protein	0,453	0,026
D3L7V3	Major myo-inositol transporter IolT	0,457	0,001
Q04GS7	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB	0,461	0,003
Q04EJ9	Muramidase (Flagellum-specific)	0,465	0,046
D3LCK7	Uncharacterized protein	0,469	0,004
A0NI78	Chromosome (plasmid) partitioning protein ParA	0,469	0,021

D3LAP1	50S ribosomal protein L1	0,469	0,002
D3LB94	Transcriptional regulator of fatty acid biosynthesis FabT	0,471	0,039
Q04DR9	Uncharacterized protein	0,471	0,015
Q04DU0	contains ATPase involved in DNA replication initiation domain	0,478	0,002
D3L9R0	Diphosphomevalonate decarboxylase	0,486	0,016
Q04DT9	Uncharacterized protein	0,487	0,044
D3L7G1	ATP-dependent helicase/nuclease subunit A	0,495	0,006
D3L7T0	Chromosome partition protein Smc	0,498	0,026
Q04G29	Phosphoglycerol transferase-like protein, alkaline phosphatase superfamily	0,499	0,027
D3L7T7	Threonine--tRNA ligase	0,506	0,001
Q04DZ3	ADP ribosyl glycohydrolase	0,507	0,005
Q04D95	RNA polymerase I and III	0,513	0,006
D3L9M8	Ribonuclease Z	0,516	0,015
Q04E19	Peptidoglycan interpeptide bridge formation enzyme	0,518	0,030
Q3MUA6	Malolactic regulator MleR	0,527	0,037
D3L9N8	Predicted N6-adenine-specific DNA methylase OS=Oenococcus oeni ATCC BAA	0,527	0,014
D3LAS9	tRNA-dependent lipid II--L-alanine ligase	0,527	0,004
Q04DM7	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3, FabH	0,527	0,014
Q04FG4	Nucleotide deoxyribosyltransferase	0,532	0,013
Q04G33	1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase	0,542	0,010
Q04FP0	Stress response membrane GTPase	0,545	0,000
D3LAF9	Trehalose-6-phosphate hydrolase	0,545	0,001
D3LBQ6	Undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase	0,549	0,008
Q04FL2	Leucine--tRNA ligase	0,552	0,021
Q04G73	50S ribosomal protein L5	0,555	0,048
Q04G75	50S ribosomal protein L14	0,556	0,019
D3LAC4	Uncharacterized protein	0,562	0,006
Q04FC0	Argininosuccinate synthase	0,567	0,001
Q04FR3	Xanthine/uracil/vitamin C permease	0,569	0,001
Q04DE8	Lipid kinase from diacylglycerol kinase family	0,570	0,018
D3L9M9	GTPase Obg	0,571	0,003
Q04GA4	Phosphoglycerate dehydrogenase related enzyme	0,572	0,000
Q04HB9	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	0,574	0,000
D3LAB1	Phosphoglycerate mutase	0,577	0,042
Q04GK7	Endonuclease MutS2	0,577	0,008
A0A1S2S3Q2	Flavodoxin	0,578	0,008
Q04FR4	Thymidylate synthase	0,582	0,018
Q04EY1	Oligopeptidase F, Metallo peptidase	0,582	0,007
Q04FF2	DNA repair ATPase	0,583	0,007
Q04D43	HD superfamily phosphohydrolase	0,583	0,001
Q04G54	tRNA pseudouridine synthase A	0,586	0,040
Q04GC2	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein, PhoT family	0,592	0,029
D3L7J7	UvrABC system protein B	0,594	0,009
D3LAL6	Septation ring formation regulator EzrA	0,597	0,004
Q04F91	Uncharacterized protein	0,598	0,032
Q04EG1	Protein translocase subunit YajC	0,598	0,013
D3L9R5	ATP-dependent RecD-like DNA helicase	0,603	0,047
D3LAR8	ATPase component of ABC transporter with duplicated ATPase domains	0,604	0,017
Q04GX9	ADP-ribose pyrophosphatase	0,604	0,013
Q04CY1	Nitrogen regulatory protein P-II	0,608	0,013

D3LAD7	Uncharacterized ATPase (AAA family) associated with cysteine desulfurase	0,609	0,022
Q04GA5	Xaa-Pro aminopeptidase, Metallo peptidase	0,611	0,007
Q04G05	Glutamate racemase	0,611	0,002
Q04EW5	5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	0,614	0,010
Q04FG0	Aminotransferase	0,615	0,014
Q04ET3	Cell division protein FtsZ	0,615	0,015
Q04D98	Cell division Trigger factor	0,622	0,018
Q04E22	Ribonuclease R	0,625	0,028
Q04E76	Transcriptional regulator in cluster with unspecified monosaccharide ABC transport system	0,626	0,017
D3LBV3	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase MurA	0,627	0,024
D3LB32	Uncharacterized protein	0,627	0,029
Q04E21	DNA helicase	0,630	0,005
D3LBY5	Tyrosine--tRNA ligase	0,635	0,046
Q04G16	Uncharacterized protein	0,635	0,027
Q04DP0	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	0,640	0,009
A0A1S2S324	Glycosyl transferase	0,640	0,005
D3L847	Proline iminopeptidase	0,640	0,003
Q04DC6	Methionine aminopeptidase	0,642	0,000
Q04E41	Gluconate permease GntP	0,643	0,004
D3LB10	capsular polysaccharide biosynthesis protein	0,644	0,032
Q04DS3	PurR: transcription regulator associated with purine metabolism	0,645	0,022
Q04D99	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	0,649	0,001
Q8RTF7	OppA1 ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	0,652	0,012
Q04E14	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	0,653	0,022
D3LA87	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase MurC	0,654	0,000
Q04F36	DNA topoisomerase 4 subunit A	0,657	0,010
Q04HG8	Predicted membrane protein	0,657	0,009
Q04EH2	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	0,665	0,017
Q04ED9	Acetyltransferase, GNAT family	0,665	0,029
Q04F49	Uncharacterized protein	0,666	0,016
Q8RTF4	OppC ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component	0,672	0,022
Q04GL5	Phosphate acyltransferase	0,673	0,003
Q04DM1	UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthase	0,675	0,021
Q04FE1	Preprotein translocase subunit YidC	0,678	0,009
Q04ER9	6-phosphogluconolactonase	0,680	0,011
Q04D33	Tryptophanyl-tRNA synthetase	0,681	0,042
Q04EX1	Phosphomevalonate kinase	0,683	0,041
Q04FP1	Peptide deformylase	0,685	0,003
Q04GX1	Alpha/beta superfamily hydrolase	0,685	0,028
D3LAL4	Valine--tRNA ligase	0,690	0,038
Q04FK2	Deoxyguanosine kinase/deoxyadenosine kinase, I subunit	0,693	0,012
D3L9T5	Adenylosuccinate lyase	0,697	0,015
D3L7H3	Glutamate--tRNA ligase	0,703	0,015
Q04GK4	Aminopeptidase C, Cysteine peptidase	0,703	0,026
Q04F73	DNA repair protein RecO	0,703	0,012
Q04HH0	Trypsin-like serine protease with PDZ domain	0,709	0,033
D3LAS1	Uracil-DNA glycosylase	0,713	0,004
Q04GT8	Predicted hydrolase of the HAD superfamily	0,715	0,019
D3LA17	Exopolysaccharide biosynthesis protein	0,717	0,028
D3LBE3	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA	0,722	0,044

Q04HG2	Chromosome (plasmid) partitioning protein ParB / Stage 0 sporulation protein J	0,723	0,042
Q8RTF6	OppA2 ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	0,725	0,008
Q04GT7	Alpha-phosphoglucomutase	0,725	0,008
D3LB39	Bifunctional protein GlmU	0,732	0,027
D3LC13	NADH dehydrogenase	0,732	0,009
Q04DC3	Acetolactate synthase, large subunit	0,737	0,001
R4HZ61	Alpha-acetolactate decarboxylase	0,741	0,014
Q04F63	DNA-directed DNA polymerase	0,741	0,050
Q04F69	Glycine--tRNA ligase beta subunit	0,743	0,002
Q04EL1	Farnesyl-diphosphate synthase	0,744	0,014
Q04HR6	Chromosomal replication initiator protein DnaA	0,744	0,027
Q04GB2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,745	0,010
D3L7Y5	Oxidoreductase of aldo/keto reductase family	0,749	0,008
Q04GB7	Phosphate import ATP-binding protein PstB	0,750	0,014
Q04ED4	30S ribosomal protein S12	0,751	0,013
Q04E20	Phosphoglycerate mutase family	0,755	0,037
Q04GE4	Acetyl-CoA acetyltransferase	0,755	0,013
D3LAN3	DNA polymerase III, subunit gamma and tau	0,757	0,040
Q04FE6	NAD metabolism hydrolase of HD superfamily	0,759	0,016
Q04ED0	Protein translocase subunit SecA	0,767	0,028
Q8RTF2	OppF ABC-type oligopeptide transport system, ATPase component	0,772	0,018
Q04FG5	Nicotinate phosphoribosyltransferase	0,775	0,021
D3LCI4	Phage replication initiation	0,776	0,018
Q04G35	Predicted hydrolase of the HAD superfamily	0,777	0,009
Q04EP6	D-lactate dehydrogenase	0,779	0,028
Q04GM4	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component	0,782	0,035
Q04E29	Guanylate kinase	0,785	0,006
Q04GC1	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein, PhoT family	0,797	0,026

Protéines sur-exprimées (ratio supérieur à 1,2 et p value<0,05)

Code	Description	Ratio	p-value
Q04EN7	Glutathione réductase	1,211	0,043
D3LBP5	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,214	0,025
Q04FQ5	Thiamine diphosphokinase	1,220	0,011
Q04G79	30S ribosomal protein S3	1,222	0,015
D3L9M3	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	1,239	0,038
D3L7F3	Aldose 1-epimerase	1,245	0,038
Q04DH3	Saccharopine dehydrogenase-like protein	1,248	0,014
Q04GK8	Signal recognition particle protein	1,260	0,040
G9WGD3	Serine hydroxymethyltransferase	1,275	0,009
Q04G03	Methyl-accepting chemotaxis-like protein	1,279	0,037
Q04HB5	Free methionine-(R)-sulfoxide reductase, contains GAF domain	1,280	0,027
D3L8A8	Glucose-6-phosphate isomerase	1,281	0,004
D3L939	6-phosphogluconate dehydrogenase	1,291	0,018
Q04GZ2	Galactokinase	1,296	0,014
D3L834	HPr kinase/phosphorylase	1,318	0,048
D3L943	Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase / Ribosylnicotinamide kinase	1,327	0,002
Q04GP1	Citrate lyase beta subunit, CitE	1,329	0,004
Q04EF1	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase	1,336	0,024
Q04GP3	[Citrate [pro-3S]-lyase] ligase, CitC	1,351	0,028
Q04EQ7	Hypothetical universel stress protein	1,356	0,006
Q04H44	Predicted dinucleotide-binding enzyme	1,357	0,031
D3LC65	Phage capsid protein	1,364	0,031
Q04FT7	Nitroreductase	1,372	0,004
D3LC56	Phage related protein	1,375	0,003
Q04G53	Uncharacterized protein	1,377	0,012
Q04FE0	rRNA methylase	1,381	0,002
Q04H13	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase	1,386	0,003
Q8VW55	Ornithine carbamoyltransferase	1,387	0,027
Q04GA8	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1,387	0,005
D3L8Q9	Aminotransferase	1,390	0,003
D3L8C7	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	1,394	0,011
D3L982	Pyruvate oxidase	1,401	0,002
D3LCI6	Phage DNA-binding protein	1,417	0,018
Q04GR6	Threonine dehydrogenase-like Zn-dependent dehydrogenase	1,441	0,038
D3LB15	Uncharacterized protein	1,460	0,020
K7WSU3	NADH:flavin oxydoreductase, Old Yellow Enzyme family	1,468	0,004
Q04EJ8	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	1,472	0,040
Q04DF2	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	1,476	0,024
D3LBB3	Ribose-5-phosphate isomerase	1,478	0,010
Q04D51	oxidoreductase	1,481	0,049
Q04FW8	Tributyryl esterase	1,486	0,012
Q04G23	ATP synthase subunit delta	1,491	0,002
D3L7H6	Aldehyde dehydrogenase A	1,508	0,010
Q04FT5	Short-chain alcohol dehydrogenase	1,509	0,007
D3L980	Fructose-bisphosphate aldolase	1,511	0,050
Q8KM29	ATP synthase gamma chain	1,526	0,003
Q04GX4	Predicted phosphoribosyltransferase	1,535	0,003
Q04HJ9	Aldo/keto reductase related enzyme	1,547	0,012
Q04HN2	Aldo/keto reductase family enzyme	1,555	0,011
Q04HR4	S4-like RNA binding protein	1,557	0,015

D3L9C3	Ribosome-recycling factor	1,559	0,015
Q04GP2	Citrate lyase acyl carrier protein, CitD	1,560	0,007
Q4A3D3	10 kDa Chaperonin GroES	1,566	0,014
D3LCL0	Uncharacterized protein	1,573	0,007
A0A0A0LZF5	Phage tail protein	1,573	0,043
Q04EP0	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface adhesin	1,582	0,042
D3L821	Uncharacterized protein	1,582	0,018
D3LC69	Phage terminase, large subunit	1,599	0,046
D3LAA0	Ribonuclease J	1,603	0,006
Q04G24	ATP synthase subunit b	1,623	0,013
Q04HR3	DNA replication and repair protein RecF	1,662	0,037
D3LC81	Uncharacterized protein	1,668	0,024
D3LBL2	Threonine dehydrogenase-like Zn-dependent	1,676	0,004
Q04HA9	Mg ²⁺ and Co ²⁺ transporter	1,676	0,046
Q04D39	Universal stress protein UspA-like nucleotide-binding protein	1,677	0,024
Q04FH9	NADPH-dependent FMN reductase	1,678	0,022
A0NHX1	PTS system, mannose-specific IID component	1,699	0,023
Q04HF5	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	1,700	0,019
Q04DC8	ADP-ribose pyrophosphatase	1,706	0,012
A0NHT1	Enolase	1,708	0,039
Q04HJ3	2,3-butanediol dehydrogenase, S-alcohol forming, (S)-acetoin-specific	1,718	0,004
D3LBU5	Alcohol dehydrogenase	1,742	0,011
G9WG59	6-phosphogluconate dehydrogenase	1,745	0,049
D3LC60	Phage major tail protein	1,752	0,005
Q04HE0	Ribonucleotide reduction protein	1,753	0,007
D3L7H7	Benzyl alcohol dehydrogenase	1,787	0,014
Q04EW1	Cysteine desulfurase	1,796	0,021
G9WIG9	Signal recognition particle protein ffH	1,797	0,035
Q04FS4	Diaminopimelate decarboxylase	1,798	0,032
D3LC70	Phage terminase, small subunit	1,806	0,009
A0A0A0M2A0	NADPH-dependent FMN reductase	1,806	0,039
D3L9S0	Fe-S cluster assembly protein SufB	1,814	0,043
Q04G02	Uncharacterized protein	1,824	0,010
Q04DD0	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit C	1,829	0,034
D3L7V6	Uncharacterized protein	1,832	0,018
D3L7I7	N-acetyl-L,L-diaminopimelate aminotransferase (	1,838	0,003
D3LC30	Uncharacterized protein	1,843	0,009
D3LB35	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	1,846	0,000
Q04GV9	Cellobiose-specific PTS system IIA component	1,856	0,004
D3L7H1	Beta-phosphoglucomutase	1,861	0,016
Q04EV9	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC	1,879	0,010
D3LAM1	Redox-sensing transcriptional repressor Rex	1,894	0,003
Q04DF9	Predicted ATPase or kinase	1,896	0,042
D3L792	Short-chain alcohol dehydrogenase	1,901	0,010
Q04G00	Uncharacterized protein	1,919	0,001
D3LCG3	TetR family transcriptional regulator	1,954	0,019
A0NK44	Transposase	1,970	0,020
D3LCI5	prophage Lp2 protein 18	1,973	0,007
Q04DQ5	S-ribosylhomocysteine lyase	1,983	0,005
Q04EU7	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	1,996	0,027
D3LAF1	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	2,035	0,001

Q04DF0	Inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	2,038	0,001
Q04DK7	D-ribose pyranase	2,038	0,004
D3L7Z4	Alcohol dehydrogenase AdhP	2,040	0,005
Q04HG9	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	2,048	0,048
Q04DC4	Thioredoxin	2,082	0,005
Q04DQ6	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	2,129	0,029
Q04FZ3	réductase	2,140	0,005
Q04D38	Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the NRAMP family	2,176	0,041
Q04CY8	Predicted redox protein, regulator of disulfide bond formation	2,195	0,007
Q04FS1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	2,208	0,010
G9WJT8	Transcription elongation factor GreA	2,209	0,034
Q04GB1	Thioredoxin réductase	2,212	0,002
Q04FG8	Permease of the major facilitator superfamily	2,225	0,015
D3LC78	Uncharacterized protein	2,286	0,005
D3LC10	Heptaprenyl diphosphate synthase, component II	2,290	0,000
D3LA20	Glutathione S-transferase	2,328	0,001
Q04HC3	NAD(P)H-hydrate epimerase	2,330	0,001
D3LC87	Uncharacterized protein	2,335	0,006
U3UBS3	1,3-propanediol dehydrogenase	2,338	0,004
D3LBP3	Uncharacterized protein	2,348	0,009
Q04HP2	cupin domain, putative	2,400	0,034
A0A1S2S1R2	Uncharacterized protein	2,400	0,026
Q04EK0	Transcription elongation factor GreA	2,415	0,009
D3LC83	Uncharacterized protein	2,419	0,003
G9WGI9	DNA polymerase	2,434	0,028
G9WIFY9	YpdF-like aminopeptidase (MP-MA-MS-AP-NP-specific)	2,446	0,031
G9WJ45	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	2,459	0,027
D3LC72	Uncharacterized protein	2,512	0,019
Q04G25	ATP synthase subunit c	2,583	0,004
K7XJR9	LtrC-like protein	2,670	0,043
D3LC52	Uncharacterized protein	2,687	0,000
K7X7C4	Addiction module toxin/antitoxin, RelB/DinJ protein	2,712	0,003
A0A1S2S032	MerR family transcriptional regulator	2,740	0,003
D3LC59	Uncharacterized protein	2,862	0,004
D3LC22	Acetyltransferase	3,041	0,001
D3LA60	Cytokinin riboside 5-monophosphate phosphoribohydrolase	3,080	0,006
Q04EI1	Integral membrane protein, interacts with FtsH	3,110	0,015
D3LCF0	Uncharacterized protein	3,149	0,029
Q04FQ8	Serine/threonine protein phosphatase	3,173	0,036
Q04HP9	D-aminoacyl-tRNA deacylase	3,295	0,035
D3L7N5	Oxidoreductase	3,442	0,001
G9WF61	Uncharacterized protein	3,752	0,021
A0A0A0M2R5	Seryl-tRNA synthetase	4,959	0,012
G9WGT7	tRNA-dependent lipid II--L-alanine ligase	5,220	0,000
G9WH65	Uridylate kinase	10,784	0,001

**Annexe 6 : Ensemble des protéines non mappées sur le génome de PSU1 pour l'EP
n° 4 aux différentes modalités 1 et 2,5 g/L d'extrait polyphénoliques T3.**

Code	Description	Ratio 1 g/L T3	p-value	Ratio 2,5 g/L T3	p-value
A0A0A0LZF5	phage tail protein	1,016	0,943	1,573	0,043
A0A0A0M020	Uncharacterized protein	1,036	0,816	1,145	0,205
A0A1S2S466	L-arabinose isomerase	0,782	0,238	0,460	0,054
A0A1S2S484	glucosyltransferase GtfG	0,964	0,959	0,793	0,792
A0NHT4	Uncharacterized protein	0,911	0,633	1,009	0,965
A0NIB3	GTP-binding protein	0,916	0,207	0,924	0,257
A0NJ81	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	0,436	0,055	0,358	0,050
A0NK44	Transposase	1,478	0,108	1,970	0,020
D3L6N6	Uncharacterized protein	0,639	0,199	0,277	0,022
D3L6N8	membrane protein	0,774	0,159	0,803	0,451
D3L730	Nicotinate phosphoribosyltransferase	1,070	0,236	1,122	0,085
D3L735	tRNA(Ile)-lysidine synthase	1,063	0,672	0,770	0,133
D3L778	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	0,546	0,151	0,435	0,109
D3L779	L-arabinose isomerase	0,652	0,003	0,309	0,000
D3L7D8	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	0,652	0,002	0,414	0,000
D3L7H7	Benzyl alcohol dehydrogenase	1,343	0,105	1,787	0,014
D3L852	Elongation factor 4	0,834	0,347	0,723	0,174
D3L980	Fructose-bisphosphate aldolase	1,363	0,089	1,511	0,050
D3L9I8	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	0,444	0,076	0,418	0,066
D3LA14	Endo-1,4-beta-xylanase A precursor	0,248	0,016	0,078	0,011
D3LA19	Transcriptional regulator	0,936	0,766	0,804	0,476
D3LA20	Glutathione S-transferase	1,222	0,202	2,328	0,001
D3LA34	Uncharacterized protein	0,884	0,644	1,307	0,194
D3LA41	putative helicase	0,864	0,388	1,247	0,156
D3LA43	Uncharacterized protein	0,930	0,545	0,936	0,512
D3LA69	Hypothetical site specific DNA-methyltransferase	1,073	0,391	1,043	0,714
D3LA82	Ribonuclease H	1,392	0,432	0,461	0,259
D3LB03	Beta-1,3-glucosyltransferase	1,441	0,325	2,138	0,056
D3LB05	Uncharacterized protein	0,685	0,466	0,386	0,067
D3LB06	Glycosyl transferase CpsG	0,851	0,179	0,901	0,474
D3LBD0	Polyphosphate kinase	1,162	0,004	1,064	0,527
D3LBG1	Uncharacterized protein	0,302	0,011	0,193	0,006
D3LBP6	Glycosyltransferase	0,699	0,319	0,692	0,315
D3LBQ2	Glycosyltransferase	0,670	0,107	0,638	0,087
D3LBQ3	Phosphoglycerol transferase and related proteins	1,427	0,179	1,519	0,336
D3LBR1	Restriction endonuclease	0,683	0,186	0,785	0,317
D3LC48	Uncharacter ized protein	0,817	0,251	1,076	0,581
D3LC49	Uncharacterized protein	1,391	0,415	1,413	0,319
D3LC50	Uncharacterized protein	0,339	0,273	0,492	0,372
D3LC52	Uncharacterized protein	1,869	0,003	2,687	0,000
D3LC55	phage endopeptidase	0,781	0,051	1,482	0,057
D3LC56	phage related protein	1,123	0,335	1,375	0,003
D3LC57	Phage tail length tape-measure protein	1,078	0,801	1,407	0,357
D3LC59	Uncharacterized protein	2,616	0,003	2,862	0,004
D3LC60	Phage major tail protein	1,103	0,441	1,752	0,005
D3LC61	Phage tail assembly	0,819	0,675	0,611	0,318

D3LC62	Phage head-tail joining protein	1,433	0,148	1,293	0,418
D3LC64	Phage DNA packaging	1,602	0,123	1,484	0,276
D3LC65	Phage capsid protein	1,093	0,346	1,364	0,031
D3LC66	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	0,980	0,869	1,362	0,057
D3LC67	Phage portal protein	1,191	0,340	1,358	0,125
D3LC69	Phage terminase, large subunit	1,145	0,258	1,599	0,046
D3LC70	Phage terminase small subunit	1,265	0,193	1,806	0,009
D3LC71	Uncharacterized protein	0,774	0,485	1,290	0,355
D3LC72	Uncharacterized protein	2,934	0,009	2,512	0,019
D3LC74	Mlc, transcriptional repressor of MalT	0,984	0,909	1,427	0,083
D3LC78	Uncharacterized protein	2,069	0,004	2,286	0,005
D3LC80	conserved hypothetical protein - phage associated	1,091	0,583	1,151	0,372
D3LC81	helicase	1,408	0,047	1,668	0,024
D3LC82	Phage replication protein	1,131	0,545	0,900	0,632
D3LC83	Uncharacterized protein	1,549	0,045	2,419	0,003
D3LC84	Uncharacterized protein	1,135	0,489	1,102	0,620
D3LC85	DNA helicase, phage-associated	0,602	0,428	0,882	0,806
D3LC87	Uncharacterized protein	1,925	0,005	2,335	0,006
D3LC92	Uncharacterized protein	1,750	0,291	1,458	0,099
D3LC93	Uncharacterized protein	0,685	0,349	1,088	0,798
D3LC95	Uncharacterized protein	0,560	0,004	0,596	0,170
D3LC96	integrase	0,997	0,994	0,737	0,622
D3LCF0	Uncharacterized protein	1,671	0,049	3,149	0,029
D3LCF1	Uncharacterized protein	1,693	0,455	1,837	0,555
D3LCF2	prophage major head protein	1,338	0,094	1,440	0,187
D3LCG0	Phage tail length tape-measure protein	0,888	0,821	1,456	0,362
D3LCG3	TetR family transcriptional regulator	1,395	0,113	1,954	0,019
D3LCI4	Phage replication initiation	0,922	0,095	0,776	0,018
D3LCI5	prophage Lp2 protein 18	1,539	0,040	1,973	0,007
D3LCI6	Phage DNA-binding protein	1,176	0,101	1,417	0,018
D3LCI7	phage protein	1,604	0,099	1,503	0,169
D3LCK3	Uncharacterized protein	1,137	0,513	1,057	0,775
D3LCK7	Uncharacterized protein	1,342	0,600	0,469	0,004
D3LCK8	Uncharacterized protein	1,232	0,688	0,883	0,837
D3LCL0	ABC transporter, ATP-binding protein-related protein	1,187	0,016	1,573	0,007
D3LCQ4	ParA-like protein	0,871	0,125	0,851	0,089
D3LCR0	Uncharacterized protein	0,603	0,017	1,236	0,075
D3LCT0	phage holin	0,359	0,231	0,329	0,221
D9J2Q2	Alpha-L-arabinofuranosidase	0,702	0,307	0,233	0,022
G9WF79	Sucrose-6-phosphate hydrolase	2,439	0,251	4,403	0,242
G9WHR4	Uncharacterized protein	2,049	0,426	1,446	0,668
G9WHT6	Uncharacterized protein	0,990	0,988	2,384	0,119
G9WJN6	Type III restriction enzyme	1,113	0,578	0,745	0,448
K7WMT8	ParB-like protein	0,617	0,212	0,205	0,062
K7WSR4	Transcriptional regulator, LysR family LysR family	0,799	0,411	1,268	0,331
K7WSS1	Replication initiator protein A	0,774	0,346	0,677	0,216
K7X7C4	Addiction module toxin/antitoxin, RelB/DinJ protein	1,051	0,930	2,712	0,003
K7XJR9	LtrC-like protein	2,315	0,068	2,670	0,043
K7XJW4	Uncharacterized protein	1,612	0,049	2,185	0,058
Q8VW54	Carbamate kinase	1,448	0,252	1,875	0,340
Q8VW55	Ornithine carbamoyltransferase	0,969	0,760	1,387	0,027

Annexe 7: Mise au point pour l'Étude du transcriptome d'*O. oeni* en présence de polyphénols.

I. Choix de la méthode et des conditions d'extraction de l'ARN

L'étude du transcriptome par la méthode RNAseq nécessitant des ARN de très bonne qualité, de nombreuses mises au point ont été nécessaires dont le choix de la méthode d'extraction ou encore le choix des modalités testées par exemple la nature des extraits de polyphénols ajoutés.

1. Méthode d'extraction des ARN développée (Dimopoulou, 2013)

La méthode développée par (Dimopoulou, 2013) a été utilisée pour l'extraction des ARN totaux de la souche LAA1 ensemencée dans différentes conditions puis les ARN ont été observés par électrophorèse.

Dans la Figure 1, on observe la migration des ARN totaux de la souche LAA1 ensemencée dans un vin blanc, additionné de 1 g/L de l'extrait T1, 2 g/L et 7,5 g/L de l'extrait T2. On remarque que les électrophorégrammes des ARN extraits des conditions en présence de l'extrait T2 présentent des bandes d'ARN à l'intensité faible, ainsi qu'une zone de forte intensité ayant un faible poids moléculaire pouvant être de l'ARN dégradé. Quand on regarde l'électrophorégramme obtenu pour la condition avec l'extrait T1, on observe une smear importante. La condition contrôle effectuée dans un vin blanc montre l'apparition de deux bandes caractéristiques de l'ARN 16S et 23S, ainsi que la présence d'une smear.

Lorsqu'on diminue la quantité de matériel déposé sur le gel d'électrophorèse de 6 μ L à 3 μ L ou 2 μ L (Figure 2), la smear disparaît dans la condition vin blanc seul faisant nettement apparaître les deux bandes d'ARN. Néanmoins, lors de l'ajout de 2 g/L d'extrait T1, on remarque que même en diminuant la quantité de suspension d'ARN, les smears et l'ARN dégradé sont toujours présents.

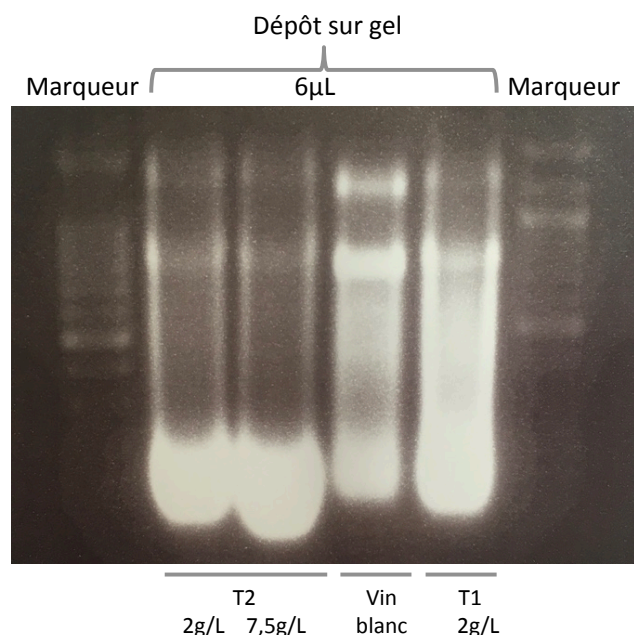


Figure 1: Effet de la concentration et du type de polyphénols sur l'extraction et la qualité de l'ARN.

La souche commerciale LAA1 lyophilisée a étéensemencée selon le protocole MBR® dans un vin blanc au pH ajusté à 3,6 dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (vin blanc seul) ou avec ajout de l'extrait T1 à 2 g/L et T2 à 2 et 7,5 g/L. Les cellules ont été récoltées après 24 h d'incubation à 20 °C et les ARN extraits selon le protocole développé par (Zhao & Zhang, 2009b; Dimopoulou, 2013).

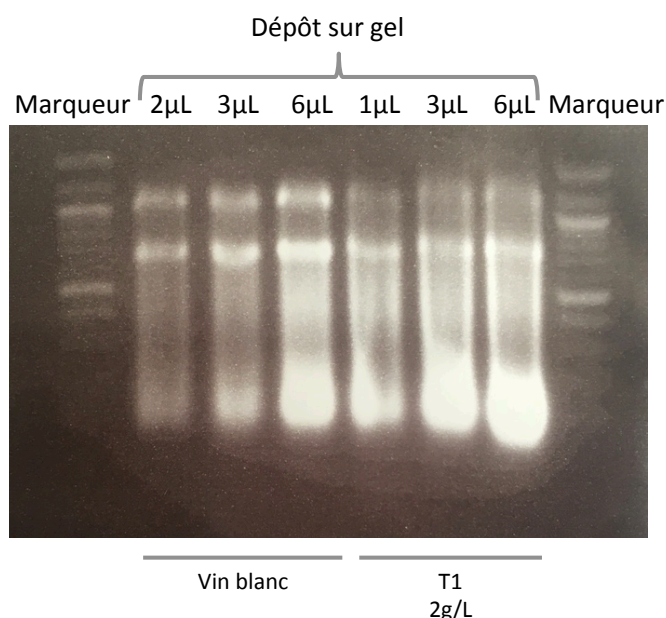


Figure 2: Effet de la variation de la quantité d'ARN déposée sur le gel d'électrophorèse en présence ou non de polyphénols.

La souche commerciale LAA1 lyophilisée a étéensemencée selon le protocole MBR® dans un vin blanc au pH ajusté à 3,6 dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (vin blanc seul)

ou avec ajout de l'extrait T1 à 2 g/L. Les cellules ont été récoltées après 24 h d'incubation à 20 °C et les ARN extraits selon le protocole développé par (Nguyen et al., 2014; Dimopoulou, 2013). Différents volumes de dépôt des ARN a été testés (2, 3 et 6 μ L).

Afin de savoir l'influence de la matrice vin, des tests ont été effectués dans l'eau, dans le vin blanc ainsi qu'additionné de 5 g/L d'extrait T1 et sont présentés dans la Figure 3.

Lorsque la souche LAA1 estensemencée dans l'eau et l'ARN récupéré après 1 h d'incubation à 20 °C, l'électrophorégramme présente deux bandes d'ARN intenses, ainsi qu'un spot intense au niveau du marqueur de faible poids moléculaire pouvant être de l'ARN dégradé.

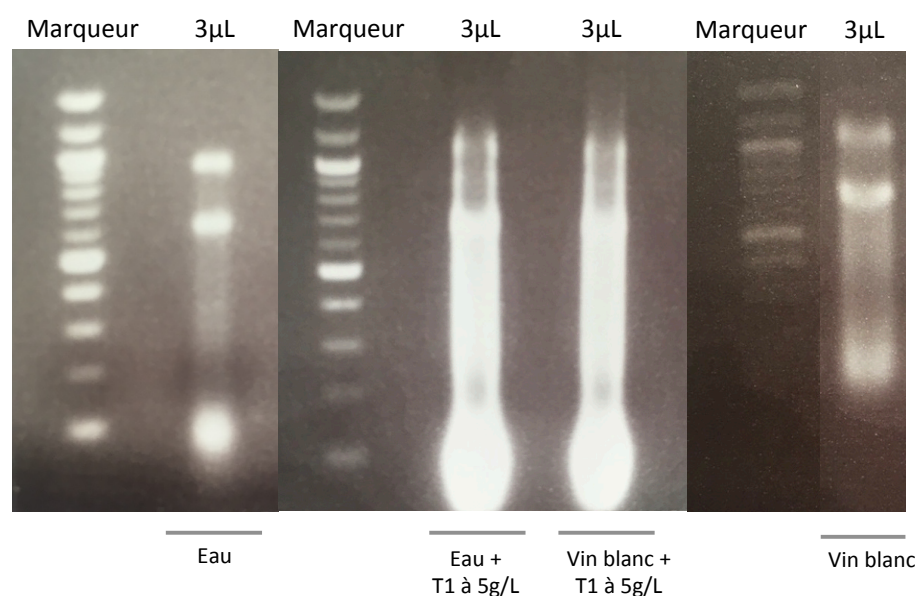


Figure 3: Effet de la matrice et de l'extrait polyphénolique T1 sur l'extraction et la qualité de l'ARN.

La souche commerciale LAA1 lyophilisée a étéensemencée selon le protocole MBR® dans un vin blanc au pH ajusté à 3,6 ainsi que dans l'eau dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols ou avec ajout de l'extrait T1 à 5 g/L. Les cellules ont été récoltées après 1 h d'incubation à 20 °C et les ARN extraits selon le protocole développé par (Coulon et al., 2012; Dimopoulou, 2013). Un volume de 3 μ L de chaque échantillon a été déposé sur le gel d'agarose.

Dans le vin blanc sans ajout de polyphénols, on note la présence des deux bandes d'ARN, une zone d'intensité moyenne au niveau du marqueur de faible poids moléculaire.

L'ajout de l'extrait T1 à 5 g/L engendre l'apparition d'une très forte smear dans les deux matrices testées, l'eau et le vin blanc. Les bandes d'ARN ne sont pas visibles dans ces conditions. On peut donc penser que les polyphénols ont dégradé l'ARN ou masque celui-ci sur le gel d'électrophorèse.

La matrice n'a donc pas d'influence sur la qualité de l'extraction avec cette méthode, car l'ARN dégradé a été observé dans les deux matrices lorsque l'extrait polyphénolique a été ajouté.

Les ARN obtenus avec cette technique en présence de polyphénols ne nous permettent donc pas de garantir des ARN de qualités.

2. Méthode d'extraction des ARN par Kit Roche®

La méthode d'extraction de l'ARN par le kit Roche® est rapide et nécessite peu de manipulation de l'échantillon. Des essais ont donc été effectués afin de déterminer l'efficacité de cette technique et la qualité de l'ARN. La Figure 4 présente les résultats des électrophorégrammes des tests effectués.

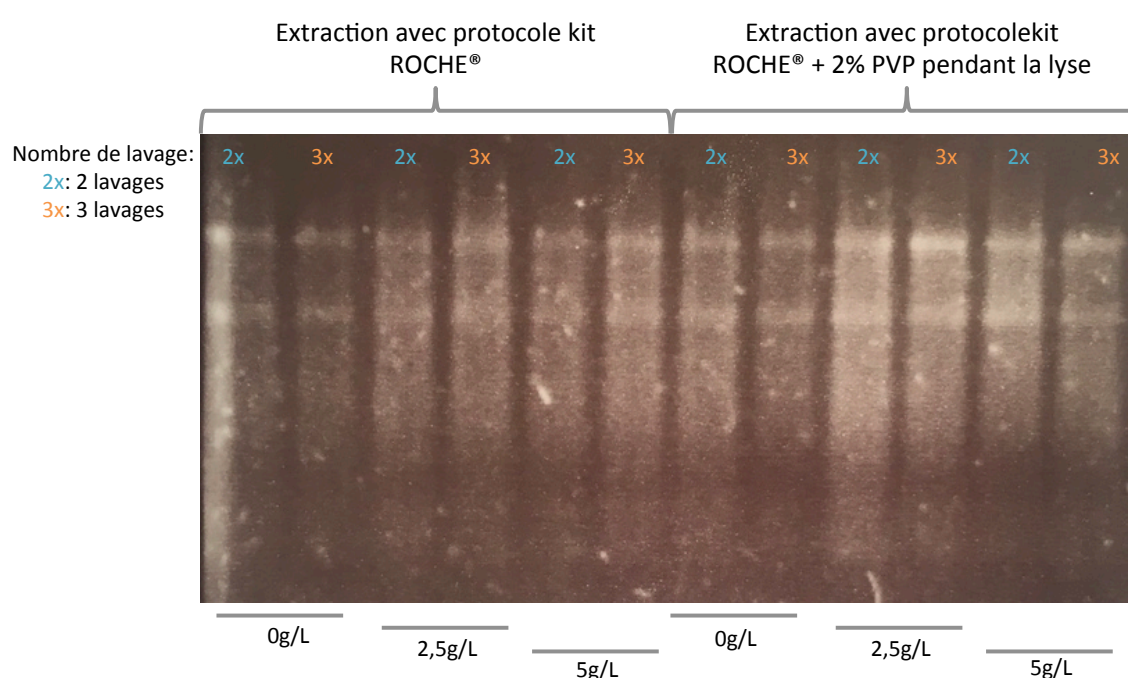


Figure 4: Influence du nombre de lavage et du mode d'extraction de l'ARN sur sa qualité de fonction de la concentration en extrait T1.

La souche commerciale LAA1 lyophilisée a étéensemencée selon le protocole MBR® dans un vin blanc au pH ajusté à 3,6 dans différentes conditions : sans ajout de polyphénols (vin blanc seul) ou avec ajout de l'extrait T1 à 2 et 5 g/L. Les cellules ont été récoltées après 24 h d'incubation à 20 °C et les ARN extraits selon le protocole basé sur le Kit Roche®. Le nombre de lavages de l'ARN a été testé (2 ou trois fois) ainsi que le mode d'extraction (ajout de 2 % de PVP dans le tampon de lyse). Un volume de 10 µL de chaque échantillon a été déposé sur le gel d'agarose.

Deux types d'extraction ont été effectués avec ou sans ajout de PVP pendant l'étape de lyse cellulaire. On remarque qu'il n'y a pas de réelle amélioration grâce à l'ajout de la PVP au niveau des électrophorégramme et donc de l'extraction des ARN.

L'ajout de concentrations croissantes d'extraits polyphénoliques T1 augmente légèrement la présence d'une smear même si les bandes d'ARN sont nettement visibles. Enfin, le nombre de

lavage n'a pas permis de diminuer de manière significative la présence des smears au niveau des différents électrophorégrammes. On peut cependant constater qu'il n'y a aucun spot au niveau du marqueur de faible poids moléculaire indiquant que la technique évite la dégradation de l'ARN. Le contrôle qualité de l'ARN a été effectué sur différents types de conditions (quantité de vin prélevé, le nombre et le type de lavage, et la concentration de l'extrait T1 ajouté au vin blanc). Le Tableau 1 présente les résultats de l'analyse au Nanodrop et au Bioanalyzer.

On peut observer que le volume de vin prélevé ayant le RIN le plus élevé sans lavage est 20 ml (F, G et H) même dans les conditions avec l'extrait T1 ajouté. Les modalités avec lavage de l'échantillon (I à N) ont des RIN élevés, ainsi que de bons rapports d'absorbance. Néanmoins l'ajout de 5 g/L d'extrait T1 (M et N) entraîne une diminution des ratios d'absorbance. Le troisième lavage ne semble pas apporter de manière significative une augmentation de la qualité de l'ARN en comparaison des risques que peut représenter une manipulation supplémentaire de l'échantillon. De la même manière, l'ajout de 2 % de PVP dans le tampon de lyse n'améliore pas l'extraction de l'ARN en présence de polyphénols (O à T).

Ces mesures nous ont donc permis de déterminer des paramètres importants comme le volume de prélèvement de l'échantillon (20 ml), le nombre de lavage (deux fois) et le mode d'extraction de l'ARN (sans ajout de PVP). Malgré tout, le RIN maximum ne dépasse pas 6,1 dans la condition contrôle sans ajout de polyphénols et lavé deux fois (I) alors que un RIN pour des ARN de bonne qualité doit au minimum être de 7.

Tableau 1: Contrôle qualité de l'ARN pour la détermination des volumes de prélèvement et du nombre de lavage de l'ARN.

Code de l'échantillon	[Extrait T1] (g/L)	Quantité de vin prélevé	Condition lavage et extraction ARN	Mesuré au Nanodrop			Mesuré au Bioanalyzer		
				[RNAtotal] (ng/μl)	Abs260/Abs280	Abs260/Abs230	RIN	ratio 23S/16S	[RNAtotal] (ng/μl)
A	0	50 ml	non lavé	90,7	1,94	1,69	6,3	1,1	98
B	2,5	50 ml	non lavé	140,5	1,88	1,5	nd	nd	nd
C	5	50 ml	non lavé	153	1,85	1,33	4,7	0,4	214
D	2,5	10 ml	non lavé	53,4	1,69	0,87	nd	nd	nd
E	2,5	10 ml	lavé	54,4	1,87	1,32	nd	0,9	90
F	0	20 ml	non lavé	30	1,83	1,04	5,9	0,6	43
G	2,5	20 ml	non lavé	93,7	1,91	1,39	5,1	0,7	149
H	5	20 ml	non lavé	85,9	1,78	1,01	4,7	0,7	175
I	0	20 ml	2 lavages	57,3	1,95	1,63	6,1	1,1	63
J	0	20 ml	3 lavages	43,3	1,97	1,07	6	0,6	34
K	2,5	20 ml	2 lavages	88,9	1,79	1,04	5,4	0,9	103
L	2,5	20 ml	3 lavages	103,4	2,01	1,49	5,7	1,1	125
M	5	20 ml	2 lavages	62,8	1,4	0,53	5,1	0,7	86
N	5	20 ml	3 lavages	67,9	1,68	0,84	5,8	0,9	117
O	0	20 ml	2 lavages + PVP	70,4	1,97	1,7	5,9	1,1	75
P	0	20 ml	3 lavages + PVP	33,3	1,98	1,49	nd	nd	nd
Q	2,5	20 ml	2 lavages + PVP	121,8	1,92	1,44	5,4	0,4	126
R	2,5	20 ml	3 lavages + PVP	84,2	1,93	1,5	5,7	1,2	172
S	5	20 ml	2 lavages + PVP	91,9	1,71	0,89	5,1	0,8	158
T	5	20 ml	3 lavages + PVP	99,9	1,82	1,11	5,8	1,1	165

nd : non déterminé

La Figure 6 présente des exemples d'électrophorégrammes obtenus pour de l'ARN de référence ne provenant pas d'*O. oeni* et deux échantillons d'ARN en condition vin blanc ou avec ajout de 5 g/L d'extrait T1. Lorsqu'on compare les électrophorégrammes à la référence (a), on remarque l'apparition juste après le front de migration dont l'intensité augmente lorsqu'on ajoute l'extrait T1 dans l'échantillon. Cette zone est considérée comme de l'ARN dégradé engendrant la diminution du RIN.

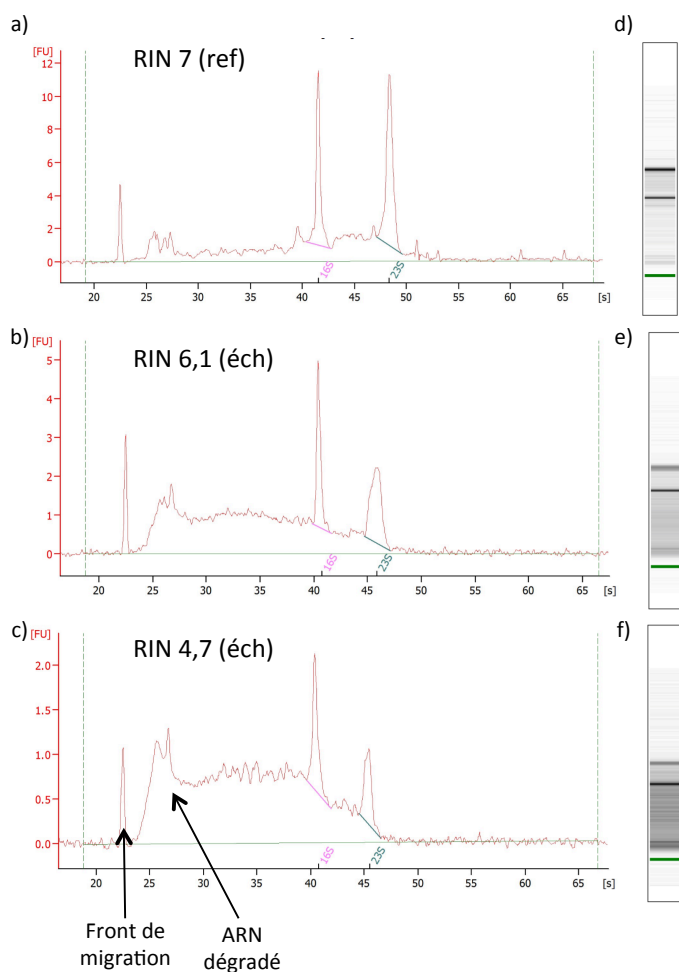


Figure 6 : Exemple d'électrophorégrammes obtenus par électrophorèse capillaire.

L'intégrité des ARN a été évaluée au Bionalayzer et des électrophorégrammes ont été obtenus. Différents profils d'élution sont présentés pour des ARN de référence sans polyphénols (a), ou des ARN extraits dans le vin blanc seul (b) ou en présence de 5 g/L d'extrait T1 (c) ainsi que les gels d'électrophorèse correspondant (d), (e) et (f).

II. Choix des conditions et préparation des échantillons

Des fermentations malolactiques ont été effectuées afin d'obtenir des échantillons cellulaires. La Figure présente les résultats des cinétiques de fermentation effectuées avec les souches LAA1 et LAD1 qui ont étéensemencées dans un vin blanc de cépage Parellada avec ou sans ajout d'extrait T1 (2,5 et 5 g/L). On remarque que l'ajout d'extrait T1 à 2,5 g/L accélère la phase de latence chez la souche LAA1 par rapport à la modalité sans polyphénols. L'ajout de 5 g/L d'extrait T1, retarde l'entrée dans la phase exponentielle, mais n'augmente néanmoins pas la durée de la FML. Chez la souche LAD1, on remarque que l'ajout d'extrait polyphénolique T1 à 2,5 et 5 g/L prolonge la durée de la FML de 1 à 2 jours respectivement.

Le choix pour l'étude transcriptomique s'est donc porté sur la souche LAA1 et les échantillons cellulaires prélevés à T24 h et à la moitié de la fermentation ont été extraits et analysés au Nanodrop.

Les résultats de l'analyse qualité sont présentés dans le Tableau 2. Parmi les répliques de chaque lot d'échantillon, il y a une qualité très hétérogène. Par exemple, dans le lot n° 1 correspondant au stade 24 h de la fermentation sans ajout de polyphénols, les RIN vont de 7 à 5,1 ainsi qu'une valeur non déterminée. De même, pour le ratio 23S/16S et les ratios d'absorbance. Les échantillons avec un ajout d'extrait T1 ont eux aussi une qualité variable au sein des répliques.

Le manque de qualité des échantillons pouvant être dû à la manipulation, l'envoi ou encore aux polyphénols eux-mêmes, ne nous a pas permis d'effectuer l'analyse RNAseq souhaitée. Un fort niveau de qualité des ARN est nécessaire pour valider les résultats obtenus par cette technique et nécessite principalement un RIN supérieur à 7 pour tous les échantillons et une concentration en ARN suffisante.

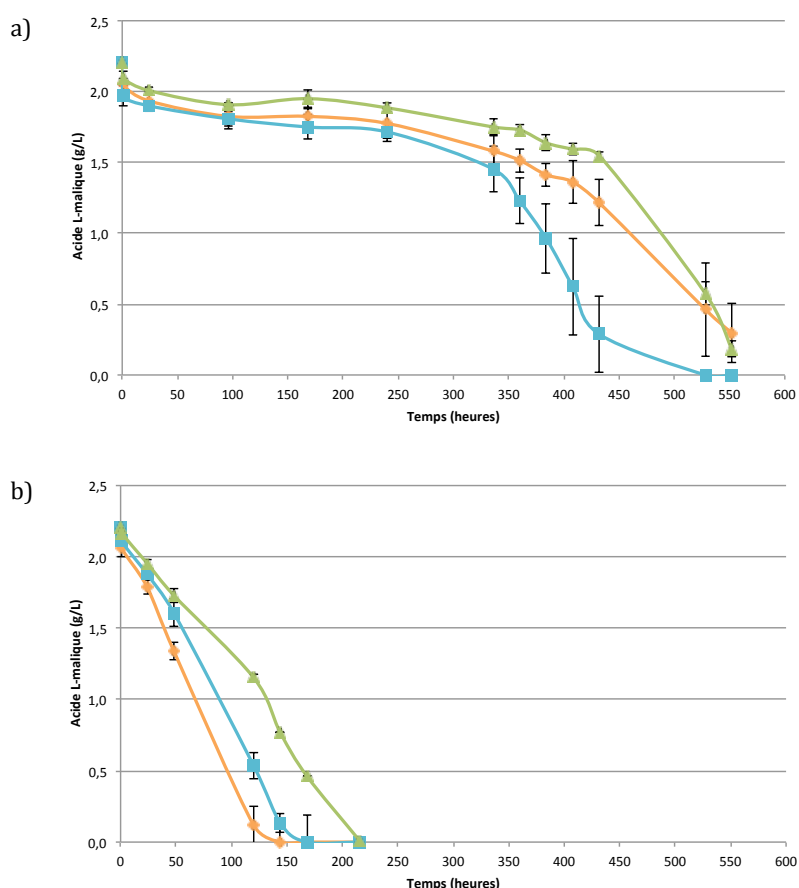


Figure 7 : Cinétique de dégradation de l'acide malique dans un vin blanc pour les souches commerciales LAA1 et LAD1 en présence de polyphénols de l'extrait T1.

Les souches LAA1 (a) et LAD1(b) lyophilisées ont étéensemencées à 2.10^6 cellules/ml selon le protocole MBR® dans un vin blanc de cépage Parellada au pH rectifié à 3,6 dans différentes conditions : sans ajout de polyphénol (orange) ou avec 2,5 g/L (bleu) et 5 g/L (vert) d'extrait T1.

Tableau 2 : Résumé des résultats de contrôle qualité des ARN pour l'analyse RNAseq.

	Code de l'échantillon	[Extrait T1] (g/L)	Stade de la fermentation	Volume(μl)	Mesuré par Nanodrop			Mesuré par Bioanalyzer		
					[RNAtotal] (ng/μl)	Abs260/ Abs280	Abs260/ Abs230	RIN	ratio 23S/16S	[RNAtotal] (pg/μl)
Lot 1	A	0	24 h	55	38,42	1,21	0,33	5,1	0,5	1,157
	B	0	24 h	55	6,37	0,85	0,3	nd	0,8	1,409
	C	0	24 h	55	5,59	0,6	0,12	7	1,4	8,87
	D	0	24 h	55	10,09	1,23	0,44	5,9	1,3	5,9
Lot 2	E	0	mi-fermentation	55	34,96	2,14	1,23	nd	1	212
	F	0	mi-fermentation	55	32,94	1,99	0,72	nd	1,3	374
	G	0	mi-fermentation	55	30,59	2,56	1,18	9,3	1,8	943
	H	0	mi-fermentation	55	25,76	2,51	1,29	7,9	1,9	678
Lot 3	I	2,5	mi-fermentation	55	79,19	1,91	0,93	8,2	2,0	834
	J	2,5	mi-fermentation	55	67,09	1,93	0,90	nd	1,7	416
	K	2,5	mi-fermentation	55	69,15	1,63	0,52	5	0,8	1,745
	L	2,5	mi-fermentation	55	87,35	1,94	0,99	2,4	0,9	419

nd : non déterminé

