



**HAL**  
open science

# Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins

Fety Jaomanjaka

## ► To cite this version:

Fety Jaomanjaka. Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0394 . tel-01968007

**HAL Id: tel-01968007**

**<https://theses.hal.science/tel-01968007>**

Submitted on 2 Jan 2019

**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**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Œnologie

Par Fety JAOMANJAKA

**Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique  
*Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation  
malolactique des vins**

Sous la direction du Pr. Claire LE HÉNAFF-LE MARREC

Soutenue le 19 Décembre 2014

Membres du jury :

**M. Gilles de REVEL**

**Mme. Mireille ANSALDI**

**Mme. Catherine FONTAGNÉ-FAUCHER**

**M. Dominique SCHNEIDER**

**Mme. Claire LE HÉNAFF-LE MARREC**

Professeur à l'Université de Bordeaux

Directrice de Recherche CNRS, Aix Marseille Université

Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble

Professeur à l'INP Bordeaux Aquitaine ENSCBP

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse



## **Remerciements**

Je tiens à remercier sincèrement M. Gilles de REVEL, Mme. Mireille ANSALDI, Mme. Catherine FONTAGNÉ-FAUCHER et M. Dominique SCHNEIDER d'avoir accepté de juger ce travail, pour leurs conseils avisés ainsi que leurs encouragements.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude envers ma directrice de thèse Claire LE HÉNAFF-LE MARREC, tout d'abord pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse et ainsi me plonger dans le monde fascinant des bactériophages. Egalement pour tous ses conseils, sa pédagogie et ses encouragements durant ces années de travail. Tu m'as toujours accordé toute ta confiance autant durant la thèse que lors de mon monitorat, cela m'a permis de grandir et de me former au métier d'enseignant-chercheur. Pour tout ça et pour avoir été une seconde mère, je voudrais te dire MERCI, et aucun autre mot ne saurait être plus juste à cet instant.

Je remercie l'Institut National Polytechnique de Bordeaux pour le financement de cette thèse.

Je remercie également Patrick LUCAS, Marguerite DOLS, Patricia BALLESTRA et Stéphanie CLUZET pour leurs précieux conseils et les nombreuses discussions scientifiques.

Je tiens sincèrement à remercier Olivier CLAISSE pour son aide si précieuse durant ces trois années, le temps qu'il a consacré à la relecture de ce manuscrit, mais aussi les discussions professionnelles et amicales lors de nos pauses-déjeuner.

Un grand merci à Tatie Cécile pour le soutien indéfectible que tu m'as toujours apporté tout au long de cette thèse.

Mes remerciements à toute l'équipe Microbiologie qui a fait que ces trois années soient inoubliables. Merci à Geoffrey, Julie, Marie, Marion et Marine B. car grâce à votre présence, le travail à la paillasse était plus animé et les journées moins longues. Merci à Maroula, la meilleure voisine de paillasse qu'on puisse avoir et aussi ma partenaire de karaoké.

J'adresse aussi des remerciements à mes collègues de bureau (Marion B., Margaux lala, Maxi-boubou, Hugo) qui ont dû me supporter dans tous mes états (Hulk, Bonhomme, Fety-



boubou) pendant la période de la rédaction de ce manuscrit. Merci à Cécile P. pour ton aide dans la dernière ligne droite.

Je tiens aussi à remercier Sandra pour les échantillons que tu m'as donné qui ont été d'une aide inestimable ainsi que les moments partagés lors de nos pauses-déjeuner.

Je remercie mes collègues de l'ENSCBP pour leur aide et leur soutien lors de mes encadrements de travaux pratiques.

Merci également à tous les étudiants et les stagiaires que j'ai encadré durant le monitorat et ma thèse, ça a été un plaisir de travailler avec vous et j'ai pu apprendre encore davantage grâce à vous.

Bien évidemment, je remercie tous mes amis, Adrien, Charline, Axel, Philou, Sophie, Elodie, Julien et Isa, pour tous ces moments qu'on a partagé qui m'ont permis de me ressourcer et de retrouver la bonne humeur à chaque fois. Merci à Hery Zo, le meilleur ami qu'on puisse avoir qui malgré la distance entre nous a toujours été là dans les moments durs.

Je tiens particulièrement à dire merci aux Fety's angels (Poupinette et Yette) car grâce à vous deux, mes journées ont toujours été ensoleillées et la période de rédaction moins dure. Poup's, pour ces petites guéguerres pour un morceau de tarte au chocolat et pour toutes les fois où tu m'as remonté le moral, des moments qui resteront gravés dans ma mémoire. Yette, pour ton sourire, ta gentillesse, les attaques de papiers au lance-pierre, les petites pauses one piece et tes encouragements, je te serais toujours reconnaissant.

Enfin merci à toute ma famille, d'abord ma famille bordelaise pour leur soutien et leur encouragement, vous avez toujours été là quand j'étais dans le besoin et votre proximité m'a permis de rester fort. Et surtout merci à mes parents, mes deux sœurs (Meva, Zara) et mon frère (Patrick) pour votre amour et votre foi en moi, car même dans les moments où je doutais, vous avez toujours été à mes côtés (malgré les 10000 km qui nous séparent), pour me pousser à viser encore plus haut.



## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION GENERALE.....1

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Partie I: *Oenococcus oeni*, la bactérie lactique du vin

1. <i>Oenococcus oeni</i> et la fermentation malo-lactique des vins .....	2
1.1. L'espèce <i>Oenococcus oeni</i> .....	4
1.2. Diversité phénotypique dans l'espèce .....	5
1.3. Diversité génétique dans l'espèce.....	6
1.4. Structure de la population.....	7
2. La non-maîtrise de la FML.....	8
2.1. Sélection de levains malo-lactiques .....	8
2.2. Autres causes d'échecs de FML ? .....	11

#### Partie II: Les bactériophages

1. Définition et Classification .....	14
2. Evolution des techniques d'étude .....	16
3. Phages et cycles de vie.....	18
3.1. Cycle lytique .....	18
3.2. Cycle lysogénique .....	19
3.3. Cycle pseudo-lysogénique .....	20
4. Organisation et évolution des génomes .....	21
4.1. Organisation modulaire.....	21
4.2. Evolution des génomes viraux.....	22
5. Nouvelles propositions de classification.....	23
6. Relations entre les phages et leurs hôtes dans les écosystèmes .....	24
6.1. Les phages sont des agents de transfert de gènes par transduction.....	24
6.2. La présence de phages modifie les équilibres entre bactéries dans les écosystèmes.....	25
6.3. La lysogénie, un mécanisme d'acquisition de capacités d'adaptation (fitness) .....	27





6.3.1. Virulence.....	27
6.3.2. Fitness.....	28
7. Applications dans la lutte contre les microorganismes .....	29
7.1. La phagothérapie.....	29
7.2. Bactériophages et sécurité alimentaire .....	30

### Partie III: Lutte contre les phages en industrie agro-alimentaire

1. Les phages des BL.....	33
1.1. Généralités .....	33
1.2. Les oenophages .....	34
2. Les mécanismes de résistance aux phages chez les BL .....	35
2.1. Inhibition de l'adsorption .....	35
2.2. Inhibition de l'injection de l'ADN .....	36
2.3. Clivage des acides nucléiques.....	36
2.4. Avortement de l'infection .....	38
3. Mécanisme de "Phage escape".....	39

### MATERIELS ET METHODES

1. Physiologie bactérienne : matériel biologique et conditions de propagation .....	40
1.1. Hôtes bactériens, conditions de culture et numération .....	40
1.1.1. Souches hôtes.....	40
1.1.2. Conditions de culture et de conservation des souches de <i>O. oeni</i> .....	40
1.1.3. Mesure de la croissance et numération bactérienne .....	41
1.1.4. Microvinifications dans un vin ayant réalisé sa fermentation alcoolique.....	42
1.2. Isolement de bactériophages infectant <i>O. oeni</i> .....	42
1.2.1. Mise en évidence/dénombrement des particules virales .....	42
1.2.2. Recherche d'oenophages .....	43
1.2.3. Purification des phages à partir des plages de lyse.....	44
1.2.4. Production de lysats concentrés .....	45
1.2.5. Nomenclature des bactériophages .....	46
1.2.6. Mise en conservation des phages .....	46



1.3. Caractérisation des bactériophages .....	47
1.3.1. Concentration des stocks par précipitation au PEG en vue de leur observation en microscopie électronique.....	47
1.3.2. Spectre de résistance .....	48
1.3.3. Adsorption.....	48
1.3.4. One-Step growth .....	49
1.3.5. Stabilité des particules virales.....	50
1.3.6. Effets des polyphénols sur les interactions phage/hôte bactérien.....	51
1.4. Obtention de clones résistants aux bactériophages .....	52
1.4.1. Isolement de dérivés lysogénisés par un phage d'intérêt.....	52
1.4.2. Obtention de mutants spontanés résistants à des phages virulents.....	52
1.4.3. Analyse de colonies présentant une pigmentation différente après infection par un phage .....	53
2. Caractérisation moléculaire des génomes bactériens et viraux.....	54
2.1. Extraction d'ADN .....	54
2.1.1. ADN génomique bactérien .....	54
2.1.2. ADN phagique.....	56
2.2. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction .....	56
2.3. Amplification d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase.....	57
2.3.1. Design et synthèse des amorces .....	57
2.3.2. PCR classique .....	57
2.3.3. PCR quantitative en temps réel.....	58
2.4. Migration des acides nucléiques par électrophorèse .....	61
2.4.1. Electrophorèse classique sur gel d'agarose .....	61
2.4.2. Electrophorèse capillaire à puce .....	61
2.5. Méthodes d'étude comparative des génomes bactériens.....	62
2.5.1. Electrophorèse en champ pulsé.....	62
2.5.2. Profils VNTR.....	64
2.6. Séquençage d'ADN .....	65
3. Analyse <i>in silico</i> des données génomiques .....	66
3.1. Assemblage et annotation des génomes bactériens .....	66
3.2. Extraction et ré-annotation des séquences prophagiques .....	67
3.3. Autres outils bioinformatiques.....	67



## RESULTATS ET DISCUSSION

### Chapitre I: Inventaire *in silico* des prophages chez *O. oeni* et évaluation de leur inducibilité

1. Panel de souches et données génomiques analysées .....	69
2. Inventaire des séquences prophagiques .....	70
3. Identification des sites d'intégration utilisés par les prophages .....	71
3.1. Méthodologie .....	71
3.2. Les prophages sont intégrés dans quatre sites distincts .....	71
3.3. De rares cas de poly-lysogénie et d'intégration en tandem .....	72
3.4. Localisation des quatre sites d'attachement majeurs sur le chromosome .....	73
3.5. Taille des sites d'attachement requis pour la RSS .....	75
4. Corrélation entre type d'intégrase et site <i>attB</i> utilisé pour la recombinaison site-spécifique .....	76
5. Des prophages en cours de curage ? .....	79
6. Fonctionnalité des prophages .....	81
6.1. Souches lysogènes pour un prophage de type D .....	82
6.2. Souches de type A (IOEB 0608, IOEB 0205, IOEB 0501, S161) et souche IOEB B10 (type B) .....	83
6.3. Souches IOEB C23 (type B) et IOEB 0502 (type A) .....	83
6.4. Souches lysogènes pour des phages de type C .....	83
7. Des sites secondaires contiennent des îlots génomiques .....	86
7.1. Îlot présent au site <i>attB<sub>E</sub></i> .....	87
7.2. Îlots présents au site <i>attB<sub>D</sub></i> .....	87
7.3. Îlots au site <i>attB<sub>F</sub></i> .....	89
7.4. Îlots au site G .....	90
7.5. Îlots au site <i>attB<sub>H</sub></i> .....	91
7.6. Îlots au site <i>attB<sub>I</sub></i> .....	91
7.7. Phylogénies des intégrases présentes chez <i>O. oeni</i> .....	92
8. Conclusion du chapitre I .....	93



## Chapitre II: Génomique comparative des prophages

1.	Organisation générale des génomes prophagiques .....	96
1.1.	Gènes conservés chez tous les prophages .....	96
1.2.	Le groupe D est homogène et différent des autres phages .....	97
1.2.1.	Généralités .....	97
1.2.2.	Génome viral « cœur » des prophages de type D .....	97
1.2.3.	Gènes variables dans le groupe D .....	100
1.3.	Des modules variables chez les prophages A, B et C.....	101
1.3.1.	Généralités .....	101
1.3.2.	Module de la lysogénie.....	101
1.3.3.	Module de réplication de l'ADN .....	102
1.3.4.	Module d'empaquetage de l'ADN (TerS-TerL-Portal protein) .....	103
1.3.5.	Module de la morphogénèse de la tête et de la partie caudale .....	103
1.3.6.	Module de la lyse .....	105
1.3.7.	Module distal.....	105
1.3.8.	Echanges de gènes au niveau du module distal.....	107
2.	Diversité des œnophages : l'apport du typage des phages du vin .....	107
2.1.	Les échantillons analysés en 2013.....	108
2.1.1.	Concentrations en phages dans les échantillons .....	109
2.1.2.	Isolement des phages et premier typage sur base de la séquence <i>int</i> .....	110
2.2.	Diversité génétique des œnophages détectés .....	111
2.2.1.	Phages de type D .....	111
2.2.2.	Typage des œnophages de type A.....	112
3.	Conclusion du Chapitre II .....	113

## Chapitre III: Multiplication et persistance des œnophages en conditions œnologiques

1.	Multiplication des phages sur leur hôte .....	117
1.1.	Impact de la température sur le choix lyse/lysogénie .....	117
1.2.	L'adsorption des œnophages est variable selon le milieu.....	119
1.3.	Déroulement du cycle infectieux dans différents milieux.....	120





1.4.	Effets des composés polyphénoliques sur la multiplication du phage $\phi$ 19-277 en milieu MRS .....	120
1.5.	Conclusion .....	122
2.	Des phages virulents sont présents dans l'écosystème : exemple du phage $\phi$ 19-277 ..	123
2.1.	Ultra-structure de $\phi$ 19-277 et spectre d'hôte .....	124
2.2.	Adsorption et paramètres de développement intra-cellulaire (one step growth curve) ...	125
2.3.	Analyse du génome de $\phi$ 19-277 .....	126
2.4.	Conclusion .....	127
3.	Persistence des oenophages dans l'environnement œnologique.....	128
3.1.	Stabilité pendant le stockage à froid et persistance dans le vin .....	129
3.1.1.	Stockage en froid positif en MRS/jus de raisin.....	129
3.1.2.	Stockage en froid positif dans le vin.....	130
3.1.3.	L'inactivation des phages est plus rapide à température ambiante .....	131
3.1.4.	Persistance comparée en vin rouge et en vin blanc.....	131
3.1.5.	Phages survivant au stockage dans le vin rouge .....	132
3.2.	Stabilité aux contraintes unitaires appliquées en bouillon MRS.....	133
3.2.1.	Stabilité à la chaleur .....	133
3.2.2.	Stabilité des oenophages en MRS acide.....	134
3.2.3.	Stabilité en présence d'éthanol en milieu MRS .....	135
3.2.4.	Conclusions.....	135
4.	Des particules non infectieuses subsistent dans le vin.....	136
5.	Stabilité des lysogènes : caractère inducteur du vin .....	137
5.1.	Obtention et vérification des clones lysogènes .....	138
5.2.	Potentiel inducteur d'une inoculation dans le vin .....	139
6.	Conclusion du chapitre III .....	141

## Chapitre IV: Résistance aux phages et co-évolution phage-hôte

1.	Spectre d'hôte des phages isolés.....	144
2.	Immunité à la surinfection chez <i>O. oeni</i> .....	145
2.1.	Immunité conférée par le prophage $\phi$ 10MC (B).....	146
2.2.	Souches lysogènes pour des prophages de type A .....	147



3.	Cas particulier de la résistance exercée par la souche IOEB 0608 vis-à-vis de $\phi$ 19-277 148	
4.	Isolement de BIMs .....	150
4.1.	Obtention des BIMs.....	150
4.2.	Analyse de la résistance aux phages des BIMs de la souche sensible IOEB S277 .....	151
4.3.	Le phénotype « colonies rouges ».....	153
	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>155</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>161</b>
	<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>184</b>



## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** La fermentation malolactique et son mécanisme cellulaire.

**Figure 2.** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques basé sur la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S.

**Figure 3.** Les différents faits marquant la recherche sur les bactériophages depuis sa découverte à nos jours.

**Figure 4.** Les différentes morphologies associées aux familles de bactériophages.

**Figure 5.** Les différents cycles de vie d'un bactériophage.

**Figure 6.** Organisation modulaire typique des gènes phagiques chez les Firmicutes.

**Figure 7.** Classification des bactériophages.

**Figure 8.** Le transfert de matériel génétique médié par les bactériophages.

**Figure 9.** Différentes théories sur le rôle joué par les bactériophages dans un écosystème.

**Figure 10.** Rôle de composés phagiques dans la pathologie bactérienne.

**Figure 11.** Mécanisme de virulence chez *Listeria monocytogenes*.

**Figure 12.** Utilisation des phages en sécurité alimentaire.

**Figure 13.** Première observation des oenophages en microscopie électronique.

**Figure 14.** Les mécanismes de résistance aux bactériophages.

**Figure 15.** Mécanisme du système CRISPR.

**Figure 16.** Les différentes étapes du protocole de "one-step-growth".

**Figure 17.** Répartition des prophages de taille > 30 kb identifiés chez *O. oeni*.

**Figure 18.** Organisation modulaire type des prophages chez *O. oeni*.

**Figure 19.** Sites *attB* potentiels utilisés par les prophages et différents îlots chez l'espèce *O. oeni*.

**Figure 20.** Localisation des quatre sites *attB* et de leurs régions flanquantes.

**Figure 21.** Comparaison entre les séquences des sites *attR*, *attL* et *attB* impliqués dans la RSS des prophages de type D chez *O. oeni*.

**Figure 22.** Phénogramme des intégrases des prophages complets et îlots identifiés chez *O. oeni* et de phages infectant d'autres bactéries lactiques.

**Figure 23.** Courbes de croissance des souches lysogènes après induction des prophages à la mitomycine C.



**Figure 24.** Quantification des particules virales libérées dans le surnageant de culture en absence et en présence de mitomycine C.

**Figure 25.** Typage des phages induits des souches double-lysogènes (type A et type C) S28 et IOEB CiNe.

**Figure 26.** Homologie entre les sites *attB<sub>F</sub>* et *attB<sub>B</sub>*.

**Figure 27.** Comparaison des séquences bordant les îlots I, H et F.

**Figure 28.** Dot plot des génomes de prophages chez *O. oeni*.

**Figure 29.** Génomique comparative des prophages du groupe D réalisée à l'aide du logiciel Mauve.

**Figure 30.** Stratégie d'empaquetage de l'ADN chez les oenophages.

**Figure 31.** Génomique comparative des prophages du groupe A, B et C.

**Figure 32.** Comparaison du module distal des prophages A, B, et C.

**Figure 33.** Schéma simplifié des différents types de vinification effectués dans les sites de prélèvement.

**Figure 34.** Evolution de la FML dans deux essais réalisés à l'ISVV.

**Figure 35.** Comparaison entre les séquences des sites *attR*, *attL*, *attB* et *attP* impliqués dans la RSS des prophages de type D chez *O. oeni*.

**Figure 36.** Profil de restriction de l'ADN génomique de phages de type D.

**Figure 37.** Cinétique de croissance de la souche lysogène IOEB 0608 en présence et en absence de Mitomycine C.

**Figure 38.** Observation en microscopie électronique des particules de  $\phi$ 0608 MC.

**Figure 39.** Taux d'adsorption de  $\phi$ 0608MC sur son hôte *O. oeni* IOEB 0608 à 20 °C ou à 25 °C.

**Figure 40.** Effets de la température sur la production virale de  $\phi$ 0608MC sur son hôte *O. oeni* IOEB S277 post-adsorption.

**Figure 41.** Modalités d'adsorption du phage  $\phi$ 34-S51 sur la souche hôte *O. oeni* IOEB S277 en milieu MRS, en milieu au jus de raisin ou en vin rouge.

**Figure 42.** Infection de *O. oeni* par des bactériophages dans différents milieux.

**Figure 43.** Infection de *O. oeni* IOEB S277 par le phage  $\phi$ 19-277 en présence ou en absence de quercétine.

**Figure 44.** Aspect des plages de lyse formées par  $\phi$ 19-277 sur la souche *O. oeni* IOEB S277.

**Figure 45.** Evolution de la croissance de la souche *O. oeni* IOEB S277 infectée par le phage  $\phi$ 19-277.





**Figure 46.** Observation des particules du phage  $\phi$ 19-277 en microscopie électronique-Centre de Microscopie, Université de Bordeaux.

**Figure 47.** Courbes de développement intra-cellulaire ou « One-step growth » des phages  $\phi$ 19-277 (A) et  $\phi$ 0608MC (B) sur la souche hôte IOEB S277 en milieu MRS $\phi$  à 25 °C.

**Figure 48.** Recherche de séquences communes entre les deux phages de type B  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC.

**Figure 49.** Profil de restriction de l'ADN génomique des deux phages de type B  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC.

**Figure 50.** Profils de restriction de l'ADN génomique de  $\phi$ 19-277, et profils virtuels des ADN prophagiques associés aux souches IOEB C23 et AWRIB202.

**Figure 51.** Persistance de trois lysats phagiques à 10 °C en milieu MRS et en milieu jus de raisin.

**Figure 52.** Persistance de deux lysats phagiques à 8 °C pendant 150 jours en milieu MRS, en milieu jus de raisin et dans un vin rouge.

**Figure 53.** Persistance de deux lysats phagiques de  $\phi$ 19-277 à 10 °C dans un vin rouge.

**Figure 54.** Persistance de phages stockés à température ambiante dans un vin rouge.

**Figure 55.** Inactivations comparées de quatre oenophages en vin rouge et en vin blanc à température ambiante.

**Figure 56.** Persistance du phage  $\phi$ 19-277 dans le vin.

**Figure 57.** Bactériophages résiduels après 15 minutes de traitement thermique.

**Figure 58.** Bactériophages résiduels après 15 minutes de traitement en milieu MRS acide (pH 3,5).

**Figure 59.** Quantification des oenophages par qPCR.

**Figure 60.** Suivi de l'induction des prophages après inoculation des souches lysogènes dans le vin, le milieu MRS en présence ou en absence de mitomycine C.

**Figure 61.** Stabilité de souches lysogènes après inoculation dans un vin rouge.

**Figure 62.** Evolution de la quantité d'acide malique dans le temps après inoculation de différentes souches lysogènes dans un vin rouge.

**Figure 63.** Schéma des structures associées au cluster 1 (A, B et C) et dirigeant la synthèse d'un composé Eps chez *O. oeni*.

**Figure 64.** Evolution des populations bactériennes et virales lors de l'infection prolongée de la souche IOEB S277 par le phage virulent  $\phi$ 19-277.

**Figure 65.** Aspect hétérogène des colonies isolées d'une culture de *O. oeni* IOEB S277 infectée par le phage  $\phi$ 19-277 lorsque la numération est réalisée sur gélose au jus de raisin.



**Figure 66.** Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé des BIMs et de la souche parentale *O. oeni* IOEB S277.

**Figure 67.** Evaluations des capacités de FML de la souche *O. oeni* IOEB S277 et sur son dérivé BIM4.

**Figure 68.** Evolution des populations bactériennes et virales lors de l'infection prolongée de la souche IOEB S277-BIM4 DC par le phage OE33SM.



## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I.** Les différents critères utilisés pour la sélection de levains malolactiques.
- Tableau II.** Les différentes familles de bactériophages.
- Tableau III.** Taxonomie actuelle des bactériophages de bactéries lactiques.
- Tableau IV.** Liste des souches de *O. oeni* utilisées lors de cette étude.
- Tableau V.** Abréviation attribuée aux différents cépages de vin utilisés pour isoler les phages.
- Tableau VI.** Liste des amorces utilisées.
- Tableau VII.** Caractéristiques générales des séquences génomiques de souches de *O. oeni*.
- Tableau VIII.** Morphotypes des phages isolés à partir de vin de Pauillac (campagne 2011).
- Tableau IX.** Typage par PCR des intégrases d'oénophages isolés du vin lors de la campagne 2011.
- Tableau X.** Répartition des différentes séquences phagiques chez *O. oeni*.
- Tableau XI.** Contenu en *orfs* des îlots F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>.
- Tableau XII.** Contenu en *orfs* des îlots H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>.
- Tableau XIII.** Conservation nucléotidique des prophages du groupe D.
- Tableau XIV.** Recherche d'homologie des *orfs* spécifiques des prophages du groupe D.
- Tableau XV.** Identités nucléotidiques entre le module de réplication partiel associé aux six prophages IOEB 0205\_A, IOEB 0608\_A, IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B, S28\_C et IOEB CiNe\_C.
- Tableau XVI.** Contenu en *orfs* du module distal des prophages du groupe A, B et C.
- Tableau XVII.** Recherche de phages sur le millésime 2013.
- Tableau XVIII.** Diversité des phages isolés lors de la campagne 2011 et 2013.
- Tableau XIX.** Typage par PCR des oénophages de type A isolés du vin.
- Tableau XX.** Spectre de résistance d'un ensemble de 34 souches de *O. oeni*.
- Tableau XXI.** Spectre de résistance de trois souches lysogènes obtenues à partir de la souche sensible IOEB S277.
- Tableau XXII.** Mise en évidence d'un système RM chez *O. oeni* IOEB 0608.
- Tableau XXIII.** Spectre de résistance de quatre clones BIMs obtenus à partir de la souche IOEB S277 en présence de plusieurs phages.



## LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

<b>Abi</b>	Abortive infection
<b>ACLAME</b>	A CLAssification of Mobile genetic Elements
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNdb</b>	ADN double brin
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNr</b>	ARN ribosomique
<b>ARNsb</b>	ARN simple brin
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>attB</b>	Site d'attachement bactérien
<b>attR</b>	Site d'attachement droit
<b>attL</b>	Site d'attachement gauche
<b>attP</b>	Site d'attachement phagique
<b>BIM</b>	Bacteriophage Insensitive Mutant
<b>BL</b>	Bactéries lactiques
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>COBALT</b>	Cobalt Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool
<b>COG</b>	Clusters of Orthologous Groups of proteins
<b>CRISPR</b>	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<b>C<sub>T</sub></b>	Cycle threshold
<b>DC</b>	Double challenge
<b>DNase</b>	Desoxyribonucléase
<b>DO<sub>600nm</sub></b>	Densité optique à 600 nm
<b>EOP</b>	Efficiency of plating
<b>Eps</b>	Exopolysaccharides
<b>FA</b>	Fermentation alcoolique
<b>FML</b>	Fermentation malolactique
<b>Gtf</b>	Glycosyltransférase
<b>h</b>	heures
<b>Hol</b>	holine
<b>HP</b>	Hypothetical protein
<b>ICE</b>	Integrative and Conjugative Element
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>Int</b>	Intégrase
<b>IOEB</b>	Institut d'OEnologie de Bordeaux
<b>IS</b>	Séquence d'insertion
<b>kpb</b>	Kilo paires de bases
<b>MC</b>	Mitomycine C
<b>MEGA</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>Min</b>	Minute
<b>mle</b>	Enzyme malolactique
<b>MLST</b>	Multi Locus Sequence Typing
<b>MOI</b>	Multiplicity Of Infection





<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>p/p</b>	Poids par poids
<b>p/v</b>	Poids par volume
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis
<b>PHAST</b>	PHAge Search Tool
<b>ppi</b>	Pour préparation injectable
<b>PRCI</b>	Phage Related Chromosome Island
<b>R/M</b>	Restriction modification
<b>RAST</b>	Rapid Annotation using Subsystem Technology
<b>RSS</b>	Recombinaison site-spécifique
<b>s</b>	Seconde
<b>Sie</b>	Superinfection exclusion
<b>tRNA</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UFP</b>	Unité Formant Plage
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>v/v</b>	Volume par volume
<b>VNTR</b>	Multiple-locus Variable Number of Tandem Repeat analysis



# **INTRODUCTION GENERALE**



Pour les vinificateurs, la fermentation malolactique (FML) est une étape nécessaire à l'optimisation de la quasi-totalité des vins. Elle est majoritairement assurée par l'espèce *Oenococcus oeni*. Sa maîtrise est un moyen efficace pour protéger la qualité et la typicité des vins, vecteurs de commercialisation. Jusqu'à présent, cette étape fondamentale du processus de vinification n'est pas toujours maîtrisée. L'explication majeure réside dans l'insuffisance de la biomasse bactérienne endogène, liée aux conditions physico-chimiques difficiles du milieu. Des solutions visant à assurer rapidement la FML sont disponibles, comme l'inoculation de souches commerciales d'*Oenococcus oeni*. Ces stratégies n'offrent toutefois pas une totale garantie de succès, et des retards ou non déclenchements de FML sont toujours observés, affectant possiblement la qualité finale du produit. Ces situations inexplicables amènent à s'interroger sur l'impact d'autres paramètres sur la fermentescibilité malolactique.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer les rôles des bactériophages antagonistes de la bactérie lactique *Oenococcus oeni* dans l'écosystème vin. Le travail s'est organisé autour de trois axes. Nous avons exploité les données génomiques correspondant à 50 souches, afin de réaliser un inventaire des prophages présents dans le pangénome d'*O. oeni*, et mettre au point des outils de détection et de typage des phages dans l'environnement œnologique. Le risque phage a été évalué en étudiant les capacités de multiplication et de survie des phages, ainsi que l'induction de bactéries lysogènes dans le vin. Enfin nous avons étudié les interactions entre *O. oeni* et ses bactériophages, en caractérisant des mécanismes de résistance bactériens.

Les résultats sont précédés d'une introduction bibliographique rappelant les données essentielles sur la bactérie modèle et la fermentation malolactique. Un état des lieux des connaissances disponibles sur (i) les bactériophages, et (ii) les mécanismes de résistance des bactéries à l'attaque virale est présenté.



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**





**Partie I :**

***Oenococcus oeni*, la bactérie lactique du vin**

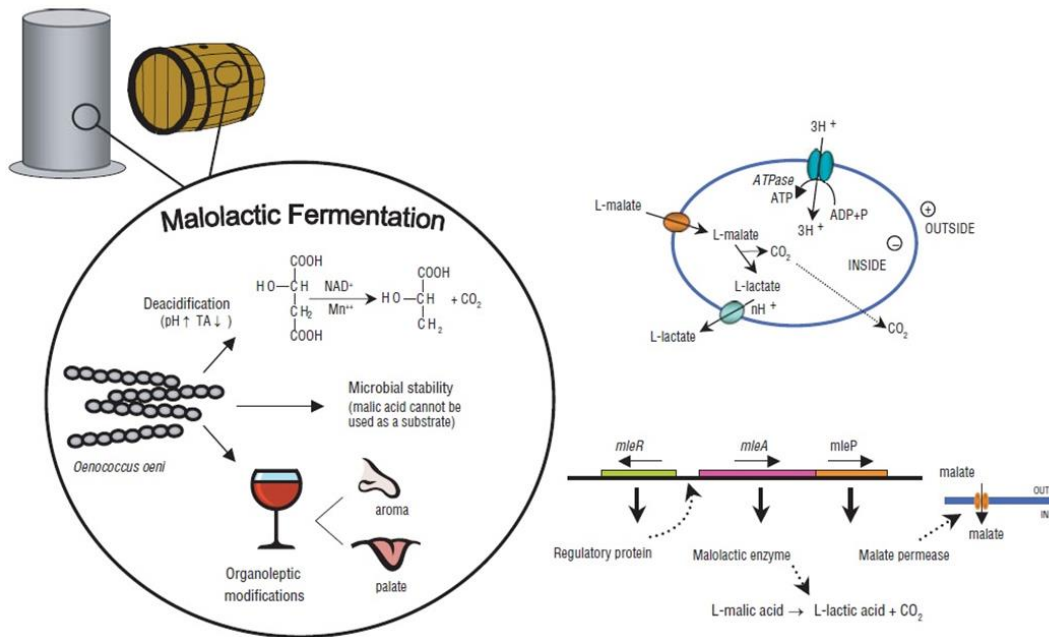


## 1. *Oenococcus oeni* et la fermentation malo-lactique des vins

La transformation contrôlée des moûts de raisin au cours de la production de vin résulte de deux fermentations successives. La première est la fermentation alcoolique (FA) réalisée par les levures (essentiellement *Saccharomyces cerevisiae*) et peut être suivie par la fermentation malolactique (FML) selon le type de vin. Il en résulte une désacidification, et une amélioration des qualités organoleptiques du vin. La FML est nécessaire pour tous les vins rouges et certains vins blancs à forte acidité. Elle est aussi appliquée pour certains cidres et champagnes (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

L'origine bactérienne de la FML a été reconnue par les premiers microbiologistes du vin à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. La FML a d'abord été décrite comme une maladie du vin, et les bactéries à l'origine du phénomène étaient alors considérées comme néfastes. L'importance de la FML dans le procédé de vinification a ensuite été reconnue dans les principales régions françaises, puis au niveau international. L'agent responsable de la FML a été décrit et caractérisé en 1967, comme étant la bactérie lactique *Leuconostoc oenos*. L'espèce a été ensuite reclassifiée dans le nouveau genre *Oenococcus*, créant l'espèce *Oenococcus oeni* (Garvie, 1967; Dicks *et al.*, 1995). *Oenococcus oeni* fait partie de la microflore variée associée à la surface des baies de raisin. Le consortium est constitué de bactéries, de levures et de moisissures. Un continuum existe entre les communautés bactériennes telluriques et les bactéries épiphytes présentes sur la baie et les autres parties de la plante *Vitis vinifera* (Martins *et al.*, 2013). Les flores présentes sont bénéfiques pour la plupart, et la participation de certaines flores indigènes aux fermentations améliore la complexité aromatique des vins. Une étude menée en Californie a montré que des facteurs liés au cépage, au millésime et au climat affectent la composition des flores associées aux grappes de raisin (Bokulich *et al.*, 2014). Ces données suggèrent l'existence d'un « terroir microbien » représentant le facteur majeur de variabilité régionale entre les baies de raisin.

Outre la présence de *O. oeni*, d'autres bactéries lactiques (BL) sont également présentes sur la baie. Leurs niveaux de populations sont faibles lorsque les mesures sont réalisées par approches culturales (Lonvaud-Funel, 1999), et il existe une dynamique de ces populations au cours des étapes de vinification. Lorsque les baies sont écrasées et transvasées dans les cuves de fermentation, la population de BL augmente, et atteint des



**Figure 1. La fermentation malolactique et son mécanisme cellulaire (Bartowsky, 2005).**

La FML permet une désacidification du vin, une stabilisation microbiologique et apporte une complexité aromatique. L'opéron responsable de cette voie métabolique chez *O. oeni* est composé de trois gènes codant respectivement un régulateur transcriptionnel (*mleR*), l'enzyme malolactique (*mleA*) et une malate perméase (*mleP*).

Le malate rentre dans la cellule sous sa forme anionique. La décarboxylation en acide lactique est suivie de la sortie de l'acide dans le milieu, ce qui entraîne une alcalinisation du milieu intracellulaire. Or le cytoplasme est déjà plus basique que le vin. Ce phénomène renforce donc la différence de pH entre le cytoplasme et le milieu. Le gradient électro-chimique qui conduit à l'entrée de protons augmente, et ce phénomène conduit à la synthèse d'ATP.

concentrations qui varient entre  $10^2$  à  $10^4$  UFC/ml. A ce stade, la flore est complexe, et est constituée de huit à neuf espèces majeures, regroupées essentiellement dans quatre genres : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*. Le moût est acide, peu oxygéné et riche en sucres (> 210 g/l). Les levures sont mieux adaptées dans ce milieu que les BL, et vont donc fermenter très rapidement les sucres présents, et modifier significativement la composition du milieu. L'initiation de la FA entraîne une augmentation de la teneur en éthanol, et la libération de différents produits issus du métabolisme des levures. Ces composés inhibent la croissance des BL (King & Beelman, 1986; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988). La concentration des BL n'excèdera pas  $10^4$  UFC/ml à ce stade. Cependant, on note des modifications dans la composition de cette flore lactique, avec une réduction de la diversité et une sélection de l'espèce *O. oeni*, qui devient l'espèce dominante en fin de FA. L'espèce est notamment capable de maintenir un pH plus basique dans son cytoplasme (proche de 6) que celui du milieu extérieur (proche de 4). En fin de FA, la population de levures diminue et la FML démarre. Elle est classiquement observée lorsque la population bactérienne atteint le seuil de  $10^6$  UFC/ml.

Le vin en fin de FA est un milieu acide et instable du point de vue microbiologique. Il contient notamment de l'acide L-malique (1 à 5 g/L). Il s'agit du deuxième acide des moûts, après l'acide tartrique. L'acide L-malique est très répandu dans le règne végétal, et correspond à l'acide principal de nombreux fruits. *Oenococcus oeni* va dégrader le substrat et se développer en réalisant la FML. Il ne s'agit pas d'une véritable fermentation. Elle conduit bien à une décarboxylation et à la synthèse d'ATP comme tous les procédés fermentaires, mais elle ne fait toutefois pas intervenir directement de cofacteurs réduits ou oxydés (**Fig. 1**). La conséquence directe de FML est une légère diminution de l'acidité totale du vin (environ 0,1-0,2 unités pH) qui est liée au remplacement d'un diacide (l'acide malique) par un monoacide (l'acide lactique). Le pH d'un vin se situera généralement entre 3 et 4 suivant les vins et les conditions de fermentations.

La dégradation de l'acide malique est nécessaire dans le vin, car elle a un rôle dans la stabilisation microbiologique du produit final. Les risques de développement d'autres bactéries sont réduits grâce à l'épuisement de la principale source de carbone (acide malique) dans le milieu. La stabilisation microbiologique n'est parfois pas totale et des flores d'altérations comme la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* peuvent s'implanter,



et produire des phénols volatiles préjudiciables. Il arrive également que des bactéries associées à la FML soient responsables d'altérations. A titre d'exemple, les premières descriptions de la maladie du vin par Pasteur font référence à la piqûre lactique et à la maladie des vins filants. Ces altérations correspondent respectivement à un départ précoce de la FML (surproduction d'acide acétique et d'acide D-lactique), et à une production de polysaccharides dans le vin par certaines BL (Pasteur, 1873; Lonvaud-Funel, 1999; Walling *et al.*, 2005).

Sur le plan organoleptique, la perception marquée et le goût acerbe de l'acide malique sont remplacés par le caractère moins agressif et légèrement lacté de l'acide lactique. La FML contribue également aux qualités du vin *via* la libération d'arômes issus de précurseurs du raisin, des levures ou du bois, et la synthèse de métabolites secondaires par les bactéries. C'est le cas du diacétyl, composé aromatique au goût beurré, produit à partir du citrate. A de faibles concentrations (< 5 mg/l), il peut augmenter la complexité et la qualité des vins, alors que des concentrations plus élevées sont dépréciables, car la molécule masque d'autres arômes (Davis *et al.*, 1986).

### **1.1. L'espèce *Oenococcus oeni***

La famille des bactéries lactiques rassemble des microorganismes largement répandus dans la nature, et associés à des environnements très différents : végétaux, alimentaires ou animaux (flores présentes dans le tube digestif des mammifères). Ce sont des bactéries à Gram<sup>+</sup>. Le terme de BL fait surtout référence à une caractéristique commune du métabolisme de ces bactéries qui est la capacité à produire de l'acide lactique par voie homo- ou hétéro-fermentaire à partir de différentes sources carbonées, dont le lactose et le glucose. Les BL sont largement utilisées par l'homme depuis plus de 4000 ans, et sont associées à la fermentation de nombreux aliments comme les produits laitiers (fromages, yaourt), les légumes fermentés (choucroute), les boissons fermentées (vin, cidre, bière) et les charcuteries (saucisson, jambon). Ces produits alimentaires sont aujourd'hui transformés dans leur grande majorité grâce à l'inoculation de BL sélectionnées (levains).



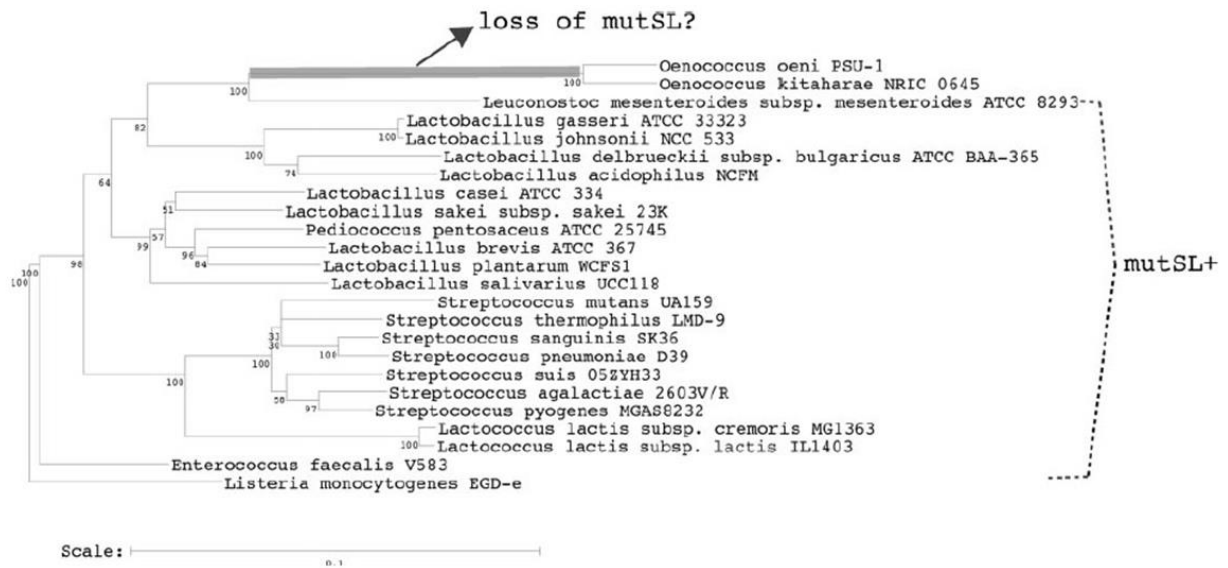


Les cellules de *O. oeni* se présentent sous forme de coques de 0,5 à 0,7  $\mu\text{m}$ , se regroupant en paires ou en chaînettes. Elles sont retrouvées à la surface de certains fruits (raisin, pomme, poire). Une approche métagénomique montre l'absence de *Oenococcus oeni* sur les feuilles de vigne (Pinto *et al.*, 2014). L'espèce *O. oeni* est hétérofermentaire, acidophile (avec un pH optimal aux environs de 4,8) et peut se développer en présence d'une certaine teneur d'éthanol (10 à 16 % vol/vol) et à une température comprise entre 20 °C et 30 °C (Dicks *et al.*, 1995).

L'espèce *O. oeni* a longtemps été classée dans le genre *Leuconostoc*. L'observation de différences phénotypiques et génétiques entre *L. oenos* et les autres membres du genre *Leuconostoc* ont conduit à sa reclassification en 1995 (Yang & Woese, 1989; Martinez-Murcia & Collins, 1990). Deux nouvelles espèces ont été décrites dans le genre *Oenococcus*: *O. kitaharae*, dont la souche type a été isolée à partir de shochu (alcool japonais à base de riz et de pomme de terre) (Endo & Okada, 2006) et *O. alcoholitolerans* isolée d'un procédé de production de bioéthanol à partir de canne à sucre (Badotti *et al.*, 2014).

## 1.2. Diversité phénotypique dans l'espèce

L'existence d'une diversité phénotypique au sein de l'espèce est reconnue depuis les années 1980, et se traduit notamment par des aptitudes variables à mener une FML (Beelman *et al.*, 1980). Il est établi que des tolérances variables à l'acidité et à la teneur en éthanol existent selon les souches analysées (Tracey & Britz, 1987; Craig *et al.* 1988; Edwards *et al.*, 1991; Solieri *et al.*, 2010; Favier, 2012). Il en est de même pour la tolérance au dioxyde de soufre, ajouté en fin de FML ou sur la vendage pour empêcher le développement des flores d'altération. Les capacités à former des arômes à partir de précurseurs glycosylés, et à changer le profil sensoriel de certains vins rouges sont également très variées (Gagné *et al.*, 2011; Malherbe *et al.*, 2012). Enfin, la variabilité des souches de *O. oeni* à synthétiser différents types de polysaccharides a été montrée (Dols-Lafargue *et al.*, 2008). Cette capacité serait un facteur important dans la capacité adaptative des souches (Dimopoulou *et al.*, 2014). En effet, la synthèse d'exo-polysaccharides permet la formation d'une capsule qui permet à la bactérie d'être plus résistante à différents stress retrouvés dans le vin (alcool, pH et SO<sub>2</sub>).



**Figure 2. Arbre phylogénétique des bactéries lactiques basé sur la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S.** Le genre *Oenococcus* est caractérisé par la perte des gènes *mutS* et *mutL* (Marcobal *et al.*, 2007).

### 1.3. Diversité génétique dans l'espèce

L'espèce *O. oeni* a longtemps été considérée comme étant une espèce homogène. Des études comparatives par hybridation ADN-ADN ont notamment révélé un fort pourcentage d'homologie (73 – 97 %) entre les souches (Dicks *et al.*, 1990). Par ailleurs le développement d'approches de typage basées sur le séquençage de l'ADN ribosomal n'ont pas généré suffisamment de polymorphisme, permettant une distinction entre les souches (Yang & Woese, 1989; Martinez-Murcia & Collins, 1990; Le Jeune & Lonvaud-Funel, 1997). L'essor de nouvelles techniques comme l'électrophorèse en champs pulsés (PFGE), la PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont modifié peu à peu la situation (Guerrini *et al.*, 2003; Lechiancole *et al.*, 2006). Progressivement une diversité génétique a été mise en évidence au sein de l'espèce. Toutefois les techniques utilisées n'avaient pas la même capacité de discrimination, ni la même reproductibilité dans les résultats. Néanmoins, la méthode PFGE par sa fiabilité et sa sensibilité s'est imposée comme étant la méthode de référence. L'utilisation d'enzymes de restriction à site rare (comme *NotI*, *ApaI* ou *SfiI*) permet une bonne discrimination de la population de *O. oeni*, et peut être utilisée pour vérifier l'implantation d'un levain malolactique (Gindreau *et al.*, 1997; Larisika *et al.*, 2008).

L'essor de nouvelles technologies pour le séquençage de génomes dans les années 2000 a donné une nouvelle dimension à ces efforts afin de mieux caractériser la diversité génétique présente chez l'espèce. Le premier génome complet de la souche *O. oeni* PSU-1 de 1,78 Mb a été publié en 2005 (Mills *et al.*, 2005). La comparaison des données génomiques obtenues avec celles provenant d'autres bactéries lactiques a montré que les gènes *mutS* et *mutL* qui codent deux enzymes clés dans le système de réparation de l'ADN (DNA Mismatch repair, ou MMR) sont absents chez *O. oeni* (**Fig. 2**). Chez *O. oeni* PSU-1 et ATCC BAA-1163, le ratio des substitutions transition/transversion est plus élevé que chez les Lactobacilles et les Bacilles (Marcobal *et al.*, 2007). Le défaut du système MMR contribuerait à l'adaptation de l'espèce *O. oeni* au milieu vin. En effet, un défaut de ce système conduit à une augmentation de la fréquence des mutations, et jouerait un rôle très important à l'adaptation de la bactérie dans un environnement contraignant (Taddei *et al.*, 1997; Prunier & Leclercq, 2005). Cette spécialisation serait à double-tranchant, empêchant la bactérie de coloniser d'autres niches. Un défaut de ce système contribue également à un phénomène



d'acquisition d'éléments mobiles. Grâce à une approche d'hybridation soustractive, de nombreux événements d'insertion/délétion (indel) ont été mis en évidence chez l'espèce (Bon *et al.*, 2009). La diversité génétique est liée à la présence de nombreux prophages et de séquences d'insertions (Zé-Zé *et al.*, 2008; El Gharniti *et al.*, 2012). Ceci a été ensuite confirmé par le séquençage haut-débit de génomes de souches supplémentaires, suivi d'une approche de génomique comparative (Bon *et al.*, 2009; Borneman *et al.*, 2010; Bartowsky and Borneman, 2011). A l'heure actuelle, le pangénome, estimé sur les données de 50 souches, contient 3235 cadres de lecture, dont 1368 constituent le génome cœur (Campbell-Sills *et al.*, soumis). Ces données actuelles ne couvrent pas la diversité génétique présente dans l'espèce, et le séquençage de nouvelles souches devrait permettre de compléter les connaissances.

#### **1.4. Structure de la population**

La mise à disposition des séquences génomiques a permis de développer une approche de phylogénie par le séquençage de différents loci ou MLST (MultiLocus Sequence Typing) chez *O. oeni*. Elle consiste à séquencer quelques gènes de ménage dans une large collection d'isolats, et de comparer les allèles. Trois études majeures ont été menées (Bilhere *et al.*, 2008; Bridier *et al.*, 2010), la dernière portant sur 258 souches d'origines diverses. Deux sous-populations génétiques majeures sont identifiées: le groupe A et le groupe B. Quelques isolats de cidre forment le groupe C (Bridier *et al.*, 2010; El Khoury, thèse). Certains sous-groupes sont associés à des régions géographiques spécifiques comme le Chili et l'Afrique du Sud, ou au type de produit comme le cidre et le champagne. Le nombre de gènes du génome cœur dans le groupe A est légèrement plus petit que celui du groupe B, qui possède donc des souches génétiquement plus diverses (El Khoury, thèse).

Très récemment la méthode de typage par VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) développée au sein de notre laboratoire a confirmé la présence de ces phylogroupes majeurs (Claisse & Lonvaud-Funel, 2012). La méthode présente l'avantage d'être plus rapide et plus discriminante que toutes les approches précédentes.



Les résultats montrent l'image d'une population caractérisée par une forte diversité allélique et des mouvements de recombinaison entre des allèles similaires, non identiques (peut-être apportés par transfert horizontal) (Bilhere *et al.*, 2008; Bridier *et al.*, 2010).

## 2. La non-maîtrise de la FML

Les effets bénéfiques de la FML sont unanimement reconnus. Toutefois, malgré les connaissances acquises sur les conditions de sa réalisation, ainsi que sur le métabolisme des BL durant cette étape, la FML demeure encore problématique. Les professionnels redoutent l'aspect aléatoire de son déclenchement. La réaction est souvent capricieuse, et nombreux sont les cas d'arrêts ou de non déclenchement de fermentation.

Le phénomène est attribué à une insuffisance de biomasse bactérienne dans le vin. Les cas de FML languissante sont associés à un risque accru de développement de flores autochtones productrices éventuelles de molécules indésirables, dépréciatrices de la qualité du produit final.

Il est cependant possible pour les œnologues de maîtriser la FML grâce à l'inoculation de souches sélectionnées de *O. oeni* en fin de fermentation alcoolique. Leur inoculation assure la rapidité de la fermentation, et réduit le risque de développement de flores d'altérations, comme la levure *Brettanomyces bruxellensis*, une levure produisant des phénols volatils qui peuvent modifier les arômes de vins et nuire à sa typicité (Renouf & Murat, 2008).

### 2.1. Sélection de levains malo-lactiques

L'utilisation de biomasses de BL pour induire la FML a été très tôt envisagée. Aujourd'hui leur utilisation est plus courante, et les procédés de sélection ont été améliorés. Ces bactéries ne montrent aucun métabolisme d'altération, et présentent une performance œnologique supérieure, c'est à dire une aptitude élevée à (i) survivre ou se développer



**Tableau I. Les différents critères utilisés pour la sélection de levains malolactiques (Torriani *et al.*, 2011).**

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

rapidement dans le vin, (ii) y assurer la transformation du malate en lactate et (iii) préserver la typicité des vins. L'addition de levains malolactiques réduit la phase de latence de déclenchement et/ou d'achèvement de la FML et, par conséquence, limite le risque de développement de la croissance de flores indésirables.

Différentes approches sont proposées pour la sélection de levains malo-lactiques. La sélection consiste à isoler un large panel de souches provenant de vins différents en cours de FML spontanée. Les vins présentant les conditions les plus contraignantes seront préférentiellement recherchés. Les différents clones sont isolés et identifiés par PCR spécifique. *O. oeni* est l'espèce couramment sélectionnée. Cependant, on rapporte l'utilisation d'autres espèces, comme *Lactobacillus plantarum* en tant que levain malolactique dans des vins à pH plus élevé (Izquierdo *et al.*, 2004). Ces étapes sont suivies d'un large panel de tests phénotypiques, réalisés en conditions de laboratoire, puis en conditions œnologiques. Ces tests phénotypiques s'avèrent longs et fastidieux. Des critères précis sont établis, et sont basés sur la tolérance des souches aux conditions extrêmes rencontrées lors de la fermentation du vin (pH faible, concentrations élevées en éthanol et en SO<sub>2</sub>) ainsi que d'autres propriétés biochimiques et technologiques (**Tab. I**) (Torriani *et al.*, 2011). La production directe ou indirecte de molécules pouvant porter atteinte à la santé humaine est également une préoccupation. C'est le cas des amines biogènes décrite chez les BL présentes dans le vin. L'apparition d'amines biogènes provient de la décarboxylation de certains acides aminés (histidine, tyrosine, ornithine) présents naturellement dans le vin (Lonvaud-Funel, 2001; Marcobal *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2008). Leurs concentrations sont relativement faibles, de l'ordre de quelques mg ou dizaines de mg par litre, mais elles sont parfois suffisantes pour nuire à la qualité sensorielle du vin (putrescine et cadavérine), ou à la santé des consommateurs (histamine). Aujourd'hui, il n'existe pas de réglementation concernant les teneurs des vins en amines biogènes, mais quelques importateurs imposent leurs propres limites.

Aujourd'hui, grâce aux nombreuses études génomiques réalisées dans l'espèce, de nouvelles stratégies complémentaires des méthodes phénotypiques ont été proposées pour la sélection de levains. Les voies métaboliques de certaines molécules étant caractérisées à l'échelle du génome (production d'amines biogènes ou de polysaccharides filants), des PCRs ciblant les gènes impliqués sont disponibles et permettent d'écarter rapidement les souches



porteuses (Walling *et al.*, 2005; Coton *et al.*, 2010). Mais la mise au point de tests génétiques permettant de repérer les capacités d'adaptation des souches au milieu vin est plus problématique. Une approche conciliant des tests biochimiques et moléculaires a été proposée par Coucheney et ses collègues (Coucheney *et al.*, 2005). Dans cette étude, la performance des souches à sélectionner est évaluée par la mesure du niveau d'expression d'un gène *hsp18*. En effet ce gène code une protéine de stress LO18 identifiée chez *O. oeni* et dont la synthèse est accrue lorsque la bactérie est en condition de contrainte (Guzzo *et al.*, 1997). Cette méthode a été combinée avec succès avec des tests phénotypiques pour évaluer les performances technologiques de plusieurs souches de *O. oeni* (Capozzi *et al.*, 2010). Une autre stratégie est d'identifier la présence de gènes mobiles, conférant des capacités adaptatives accrues aux souches porteuses. L'utilisation d'un ensemble de gènes d'intérêt a été proposé, incluant le gène *dps* (Delaherche *et al.*, 2006; Athané *et al.*, 2008), mais les mécanismes semblent plus complexes que la seule présence de ses gènes. Récemment, la présence des gènes plasmidiques *tauE* et *oye* a été corrélée à la performance technologique de levains malolactiques (Favier *et al.*, 2012). Le premier gène code une perméase, qui serait impliquée dans le transport de sulfites. Ce point est important car la résistance à ce composé est un facteur intéressant pour le développement de souches commerciales. Le second gène code une NADH: flavine oxydoréductase, dont le rôle n'est pas clairement établi, et qui pourrait être impliquée dans la réponse à un stress oxydatif (Brige *et al.*, 2006; Weinitschke *et al.*, 2007).

Les levains malolactiques sont stabilisés par lyophilisation. Ils sont ajoutés en mode séquentiel (après le levurage permettant la FA), ou bien en co-inoculation. La co-inoculation consiste à rajouter les levains malolactiques 24 à 48 h après le démarrage de la FA. Elle présente l'avantage de permettre aux bactéries de mieux s'acclimater au milieu, et de s'implanter plus efficacement.



## 2.2. Autres causes d'échecs de FML ?

Les causes classiques d'échec de FML sont liées à un manque de biomasse bactérienne face aux difficultés physico-chimiques du moût. Une piste biologique a néanmoins été explorée à partir des années 1975, et l'hypothèse selon laquelle le manque, ou la réduction de la biomasse, serait la conséquence d'une prédation par des bactériophages spécifiques a été envisagée. En effet, différents auteurs ont observé la présence de phages dans le vin et leur capacité à détruire *O. oeni* (Sozzi *et al.*, 1976; Sozzi *et al.*, 1982; Cazelles & Gnaegi, 1982 ; Henick-Kling *et al.*, 1986). L'observation ultérieure de la sensibilité de quelques phages à l'acidité et au SO<sub>2</sub> (Davis *et al.*, 1985; Poblet-Icart *et al.*, 1998), ainsi que le manque d'outils génétiques ont entraîné l'arrêt progressif des recherches sur la problématique. L'incidence des bactériophages infectant *O. oeni* (ou oenophages) dans l'écosystème moût-vin, et leur impact éventuel sur la qualité et la typicité finales du produit restent à établir. L'apport de ces connaissances est important afin de comprendre, et peut-être mieux maîtriser le déroulement des fermentations spontanées. Il peut être également une source de données nouvelles, renseignant sur la pertinence et la manière d'intégrer la présence de phages dans le travail de sélection des levains malolactiques.



**Partie II :**

**Les bactériophages**



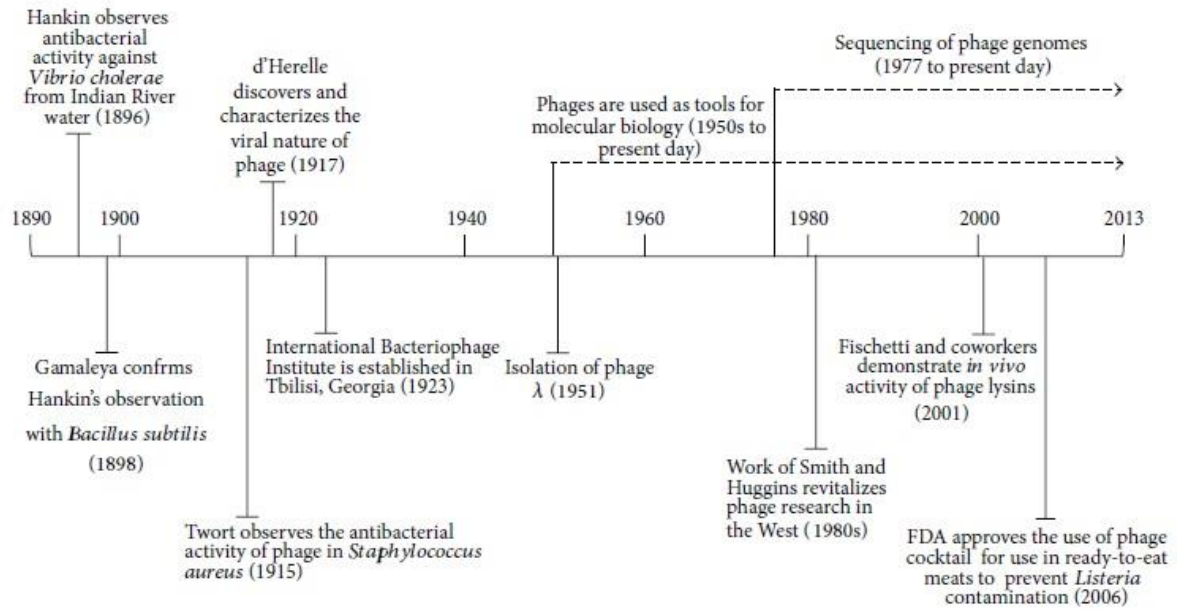


Figure 3. Les différents faits marquant la recherche sur les bactériophages depuis leur découverte à nos jours (Elbreki *et al.*, 2014).

La découverte des bactériophages s'est faite indépendamment par deux chercheurs, le bactériologiste anglais Frederick Twort en 1915, et le biologiste franco-canadien Félix d'Hérelle en 1917 (**Fig. 3**). Twort a d'abord rapporté l'observation d'étranges colonies de microcoque d'apparence translucide, et a conclu que leur apparition était due à un agent infectieux filtrable, capable de se multiplier au profit de la survie de la bactérie (Twort, 1915). En 1917, d'Hérelle poursuit ses travaux sur la dysenterie bacillaire (D'Herelle, 2007). Il observe que les selles de sujets convalescents sont douées de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille de la dysenterie. Il utilise pour la première fois le terme "bactériophage obligatoire" pour qualifier ce microbe invisible, capable de lyser des cultures bactériennes. Il propose déjà l'idée que le phénomène ne se limiterait pas à la dysenterie, et existerait chez d'autres bactéries. Pour d'Hérelle, la nature biologique des bactériophages est indiscutable, alors que d'autres auteurs proposent à l'époque une nature plutôt biochimique (Duckworth, 1976). La nature biologique des bactériophages n'a été unanime qu'à partir de 1942, grâce à la microscopie électronique qui permis d'observer les particules virales (Luria & Anderson, 1942).

L'étude des bactériophages a permis l'essor de la biologie moléculaire. Leur simplicité structurale et biologique en a fait un organisme modèle et un outil d'étude des processus fondamentaux du vivant. La relation indissociable phage/hôte signifie que toutes les connaissances de la biologie des phages sont informatives de celles de son hôte, et concernent souvent des faits plus généraux. L'étude des phages est à l'origine de nombreuses découvertes, parmi lesquelles le rôle de l'ADN comme support de l'information génétique, la présence d'un intermédiaire ARN dans la synthèse protéique et la découverte des systèmes de restriction/modification ou R/M (Hershey & Chase, 1952; Volkin & Astrachan, 1956; Arber, 1966). Par ailleurs, la simplicité du génome du phage phiX174, en a fait le premier génome séquencé, à l'origine de ce qu'on appelle aujourd'hui "le séquençage selon la méthode de Sanger" (Sanger *et al.*, 1977).

La capacité des phages à lyser la cellule bactérienne expliquait les premiers succès de d'Hérelle obtenus dès 1919 dans le traitement d'enfants atteints de dysenterie bacillaire (d'Herelle, 1931). L'utilisation de phages comme agents thérapeutiques ("phagothérapie") a inspiré des travaux similaires portant sur d'autres maladies bactériennes. L'engouement pour la phagothérapie s'est progressivement estompé, dû en partie à des résultats souvent



non reproductibles ou inconsistants. La découverte de la pénicilline en 1928, et l'ère de l'antibiothérapie qui a suivi dans les années 1940, ont également largement contribué au déclin de l'intérêt pour la phagothérapie (Wittebole *et al.*, 2014). De ce fait la recherche dans ce domaine a été plus ou moins abandonnée dans les pays de l'Ouest, alors qu'elle est restée dynamique en Pologne, et dans des pays de l'ancienne Union Soviétique en général. Ainsi l'Institut Eliava, fondé en 1923 en Géorgie, et l'Institut Hirsfeld en Pologne (fondé en 1952), ont poursuivi leurs études jusqu'à présent, et sont à l'origine de travaux très détaillés sur des essais cliniques basés sur l'administration de phages (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Aujourd'hui, aucune classe d'antibiotiques n'a échappé à un mécanisme de résistance bactérienne (Levy and Marshall, 2004). Face à l'émergence rapide de ce phénomène, et au nombre limité de molécules nouvelles, un regain d'intérêt pour la phagothérapie s'observe dans les pays occidentaux, et ailleurs (Merril *et al.*, 2003; Reardon, 2014; Vandamme, 2014). Un projet européen d'envergure nommé Phagoburn (<http://www.phagoburn.eu/>) a vu le jour en juin 2013. Il intègre la réalisation d'essais cliniques dans le but de tester l'efficacité thérapeutique, l'innocuité et la pharmacodynamique de deux cocktails de bactériophages. Ces cocktails sont destinés à traiter des patients brûlés dont les plaies sont surinfectées par des germes résistants appartenant aux espèces *Escherichia coli*, ou *Pseudomona aeruginosa*. Le NIAID américain (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) dans son rapport prospectif 2014 considère la phagothérapie comme une alternative face à la résistance aux antibiotiques (Reardon, 2014).

La phagothérapie ne ferait que reproduire un mécanisme *in vivo* et fonctionnel au niveau du mucus (Barr *et al.*, 2013). L'adhésion des phages au mucus *via* des domaines Ig-like de la capsidite permettrait une forme d'immunité ne dépendant pas de l'hôte.

Enfin, si les capacités lytiques des phages sont exploitées dans le traitement antibactérien dans le domaine médical, ces mêmes capacités posent de sérieux problèmes dans le domaine des industries agro-alimentaires mettant en œuvre des fermentations. Les contaminations en phages dans les sites de production, et tout particulièrement ceux dédiés à la transformation du lait, provoquent des échecs, ou des ralentissements de productions,

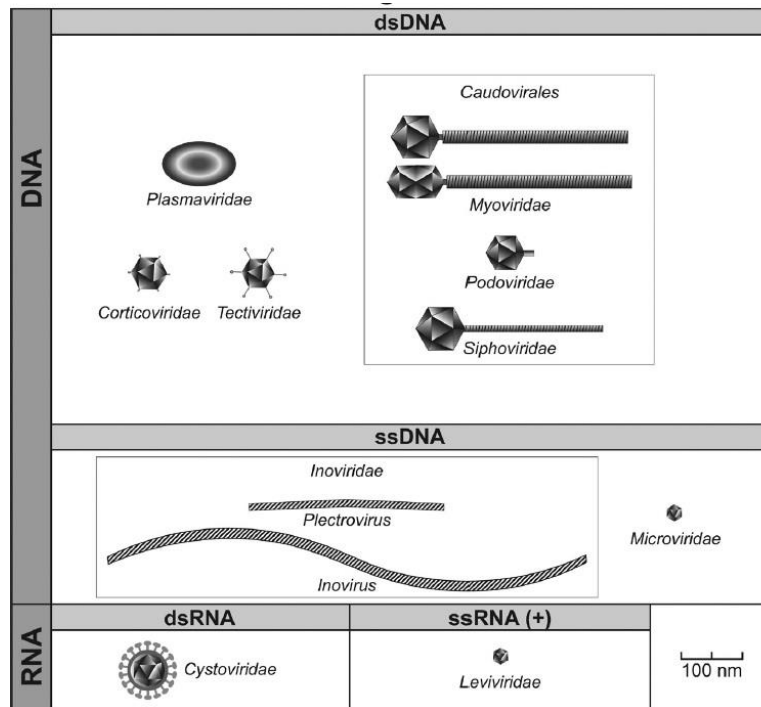


nuisant aux qualités finales du produit. Selon Moineau & Levesque (2005), il s'agit d'un facteur important en matière de perte économique, affectant 10 % des productions laitières.

## **1. Définition et Classification**

Les bactériophages (ou phages) sont des virus infectant les (Eu)bactéries. Ils se caractérisent par une petite taille (de l'ordre du nm) et se composent essentiellement d'un seul type d'acide nucléique, soit ADN ou ARN (simple brin ou double brin); d'une structure protéique ou lipoprotéique, nommée capsid, qui protège l'acide nucléique. Ces entités ne disposent d'aucune machinerie cellulaire liée aux processus de traduction, de transcription et à la production d'énergie. Les bactériophages sont incapables d'infecter des cellules appartenant aux autres domaines (Eucaryotes et Archées). Dans le passé, les virus infectant les Archées ont souvent été confondus avec les virus de bactéries (phages) car ils semblaient présenter des morphotypes communs. Toutefois, il a été clairement établi que les virus des Archées forment un groupe spécifique et distinct des bactériophages, de par leur morphotype, leur génome, ainsi que la nature des protéines codées (Prangishvili *et al.*, 2006; Prangishvili, 2013). Les phages sont retrouvés partout où leurs hôtes potentiels sont présents. La population bactérienne étant estimée à  $10^{30}$  cellules dans la biosphère, et en tenant compte du ratio phage/bactérie de l'ordre de 10/1, la population phagique de la biosphère serait de l'ordre  $10^{31}$  particules (Whitman *et al.*, 1998; Wommack & Colwell, 2000). Les phages sont donc les organismes les plus abondants de la planète.

Le monde scientifique a rapidement cherché à jeter les bases d'une classification des phages. La description morphologique a été possible grâce à l'avènement de la microscopie électronique à partir de 1942. Cependant la nature des critères à prendre en compte dans la description des morphotypes n'étant pas définie, des redondances sont apparues dans les travaux. En 1962, Lwoff, Horne et Tournier ont proposé un schéma de classification basé sur la morphologie des virions, ainsi que la nature de leur acide nucléique, et une nomenclature utilisant des noms en latin (Lwoff *et al.*, 1962). Toutefois, ce sont les travaux de Bradley en 1967 qui ont permis une première classification consensuelle des bactériophages. Ces



**Figure 4. Les différentes morphologies associées aux familles de bactériophages (adaptée de King *et al.*, 2012).**

derniers sont divisés en six grands morphotypes (groupe A à F), selon l'aspect de leur capsid et la nature biochimique de leur génome (Bradley, 1967). Le groupe A regroupe les phages ayant une tête icosaédrique, et possédant une queue contractile munie de fibres et de spicules. Les phages du groupe B diffèrent de ceux du groupe A par la présence d'une queue non contractile, dotée de fibres plus courtes. Les phages du groupe C sont également caudés mais l'appendice est court, et non contractile. Les phages des groupes D et E sont dépourvus de partie caudale et ressemblent plus à certains virus humains. Ils possèdent une tête icosaédrique, et se différencient l'un de l'autre par la nature biochimique de leur acide nucléique. Les premiers sont à ADN et les seconds à ARN. Enfin, le dernier groupe F regroupe les phages filamenteux, qui, à l'époque n'avait qu'un seul représentant. La classification de Bradley a été modifiée et s'est progressivement enrichie (Ackermann & Eisenstark, 1974). La classification a été ensuite adoptée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), organisme international, dont l'objectif majeur est une mise à jour constante du système de classification et de la nomenclature des virus (Wildy, 1971).

Le dernier rapport de l'ICTV reconnaît 2284 espèces de Virus réparties en 6 ordres, 87 familles, 19 sous-familles et 349 genres (King *et al.*, 2012). Les bactériophages sont classés en 10 familles, dont trois constituent l'ordre des Caudovirales (**Fig. 4 ; Tab. II**). Sur la période allant de 1959 à 2012, 6300 virus de procaryotes (Eubactéries et Archées) ont été décrits morphologiquement, dont 6196 bactériophages (Ackermann & Prangishvili, 2012). L'ordre des Caudovirales constitue 96,3 % de ces phages, et est composé des familles *Myoviridae*, *Siphoviridae*, et *Podoviridae* (**Fig. 4**). Ces familles correspondent respectivement au groupe A, B et C de la classification de Bradley. Leur matériel génétique est constitué d'un ADN double brin. Les membres de la famille des *Siphoviridae* sont de loin les plus abondants (57,3 %).

Les sept familles supplémentaires de la classification (**Fig. 4 ; Tab. II**) sont représentées par les phages filamenteux, polyhédriques et pléomorphiques, et ont un contenu en acide nucléique et une morphologie variables (**Fig. 4**). En effet les virions de ces familles peuvent contenir des lipides dans leur capsid, ou une enveloppe lipoprotéique (Ackermann, 2007, 2011).



**Tableau II. Les différentes familles de bactériophages (adapté de Ackermann, 2011, 2007).**

Order or family	Nucleic acid, particulars, size	Member	Number
Caudovirales	dsDNA (L), no envelope		
<i>Myoviridae</i>	Tail contractile	T4	1312
<i>Siphoviridae</i>	Tail long, noncontractile	$\lambda$	3262
<i>Podoviridae</i>	Tail short	T7	771
<i>Microviridae</i>	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	$\phi$ X174	38
<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	PM2	3?
<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (L), inner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	PRD1	19
<i>Leviviridae</i>	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
<i>Cystoviridae</i>	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	$\phi$ 6	3
<i>Inoviridae</i>	ssDNA (C), filaments or rods, 85–1950 x 7 nm	fd	66
<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MVL2	5

ss: single strand; ds: double strand; L: linear; C: circular

## 2. Evolution des techniques d'étude

L'étude des bactériophages passe par une étape élémentaire d'isolement et de purification. La méthode traditionnelle est la technique dite de la double-couche. Elle consiste à mettre en contact l'échantillon préalablement filtré (0,2  $\mu\text{m}$  ou 0,45  $\mu\text{m}$ ) avec une fine couche de géloseensemencée avec un hôte sensible. La formation de plages de lyse indique la présence du phage. Toutefois, la technique possède ses limites. En premier lieu, elle nécessite la possession d'une souche sensible, dans les collections à disposition. La formation de plages peut ensuite être limitée par la fragilité/grande taille/formation d'agrégats des particules, notamment si l'échantillon est filtré/centrifugé. Ainsi, certains mycobactériophages peuvent atteindre des tailles de 400 nm (Stella *et al.*, 2013). Les phages « Jumbo » contiennent par définition des ADNs dont la taille est supérieure à 200 kb (Hendrix, 2009). Du fait de l'application de protocoles impliquant la filtration ou la centrifugation, l'existence de phages de taille importante a longtemps été ignorée. Enfin, les phages peuvent également être adhérents à la surface de particules présentes dans l'échantillon limitant la formation de plages (Garneau & Moineau, 2011). Des modifications sont parfois nécessaires au niveau de la composition du milieu de croissance de la bactérie hôte, dans le but de permettre la formation, ou d'augmenter la taille, des plages (Lillehaug, 1997; Serwer *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). On peut citer la nécessité d'ajouter certains acides aminés dans la culture de souches de *E. coli* productrices de shiga-toxine (Nejman-Falenczyk *et al.*, 2012), ou encore de  $\beta$ -glycérophosphate ou de glycine pour les cultures de *Streptococcus thermophilus* (Le Marrec *et al.*, 1997).

L'obtention de plages permet d'isoler le phage, de le multiplier et ensuite de le caractériser morphologiquement. Les interactions avec l'hôte peuvent ensuite être abordées. Aujourd'hui de nouvelles techniques complètent les méthodes traditionnelles à l'exemple de la microscopie en force atomique, utilisée pour déterminer la vitesse d'adsorption et les capacités du phage AP22 à disperser les agrégats de cellules de *Acinetobacter baumannii* (Dubrovin *et al.*, 2012).

Lorsqu'un couple hôte-phage est trouvé, la méthode de la double-couche permet la quantification du nombre de phages présents dans un échantillon. Dans des écosystèmes complexes (océans, sols, tractus gastro-intestinal), de nouvelles techniques basées sur la

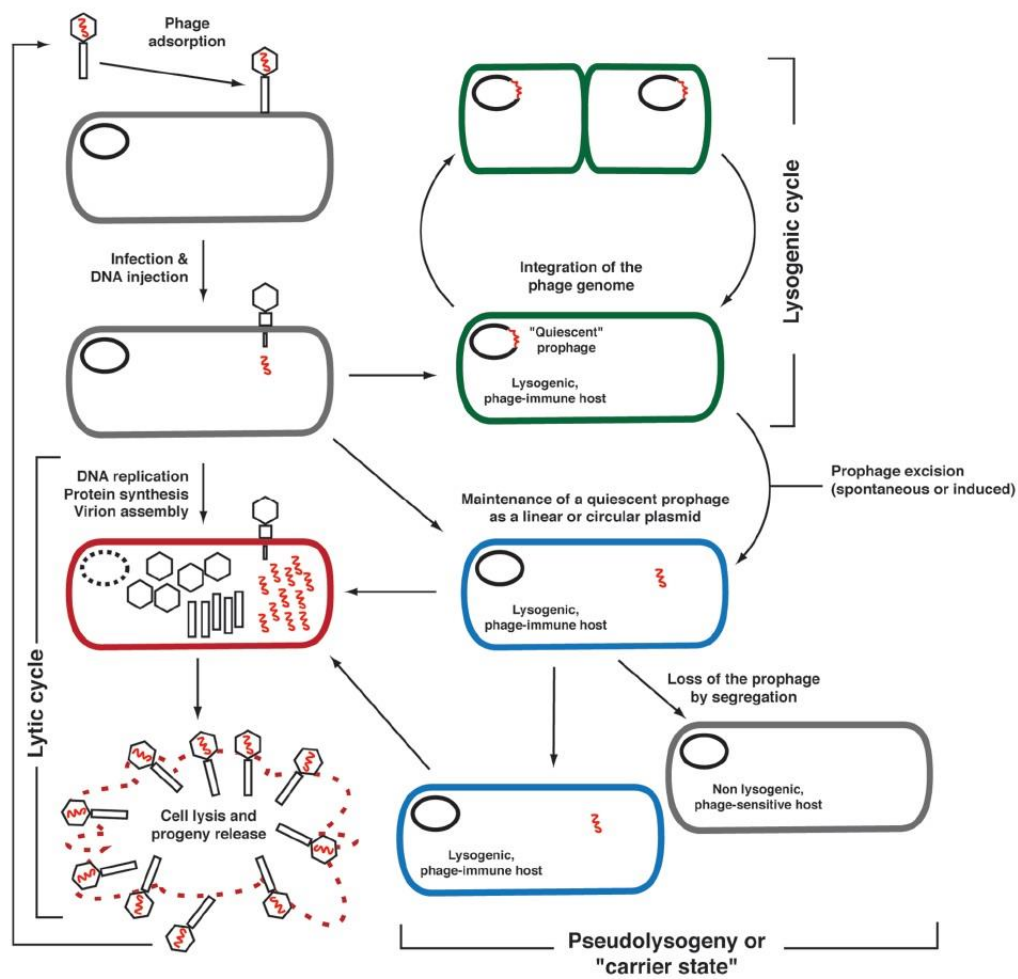


microscopie à épifluorescence permettent de s'affranchir de la possession d'un hôte pour quantifier les phages. La quantification peut être réalisée directement à partir des échantillons, ou après leur concentration (Suttle & Fuhrman, 2010), après marquage au SYBR Green, ou au SYBR Gold. L'approche permet de quantifier des "virus-like particles", qui représentent dans leur grande majorité des virus de bactéries, à l'état de particules infectieuses ou non (Breitbart & Rohwer, 2005).

La mise à disposition de génomes phagiques et leurs comparaisons ont permis l'essor de nouvelles techniques plus rapides et sensibles de quantification par qPCR (Lunde *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2011; Ly-Chatain *et al.*, 2011). Par ailleurs, d'autres types de PCR (Multiplex, "Random amplified polymorphic DNA", Multilocus sequence typing) sont utilisés pour le typage et la détection des phages (Labrie & Moineau, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2011; Moisan & Moineau, 2012).

L'utilisation d'approches de métagénomique permet aujourd'hui de visualiser la diversité des bactériophages dans un échantillon, sans nécessité de devoir multiplier le phage sur un hôte (Breitbart & Rohwer, 2005; Mills *et al.*, 2013). Récemment, cette technique a permis l'identification d'un nouveau bactériophage nommé "crAssphage", qui est présent au niveau de la flore fécale humaine. Il représente une grande majorité des séquences retrouvées dans le virome de différents individus (Dutilh *et al.*, 2014). Les progrès dans les techniques de séquençage et d'analyse des données sont tels, que l'identification *in-silico* d'un hôte potentiel a été possible. Elle a passé par la recherche de séquences du "crAssphage" dans les loci CRISPR des séquences bactériennes, et a permis de proposer que l'hôte appartient aux genres *Prevotella* ou *Bacteroides*.

Les études métagénomiques montrent que le rapport entre les bactéries et les phages diffère selon l'environnement. Il est de 5-10/1 dans l'océan, et de 1/1 dans le tractus gastro-intestinal. D'autre part, la diversité en phages est supérieure dans les écosystèmes ouverts.



**Figure 5. Les différents cycles de vie d'un bactériophage.** Le phage s'adsorbe sur son hôte bactérien et injecte son ADN dans le cytoplasme. Une fois dans la cellule, les phages dits **lytiques**, initient très vite la synthèse des protéines virales et la réplication de leur génome. Les néo-virions sont libérés dans le milieu extérieur après la lyse de la cellule. Alternativement les phages dits **tempérés** peuvent faire le choix de la lysogénie. L'ADN injecté dans le cytoplasme est intégré dans le chromosome bactérien. Le prophage peut rester intégré et être transmis aux cellules filles. Le prophage peut s'exciser du génome bactérien et initier un cycle lytique. L'état de **pseudolysogénie** correspond à un état intermédiaire entre le cycle lysogénique et le cycle lytique. Le prophage à l'état circulaire ou linéaire, non intégré, peut être perdu lors de division cellulaire (Fortier & Sekulovic, 2013).

### 3. Phages et cycles de vie

Les bactériophages sont des parasites obligatoires. Leur cycle de vie peut se décomposer en plusieurs étapes : l'adsorption, l'injection de l'acide nucléique, l'expression et la réplication de ce dernier, l'assemblage des virions et leur libération de la cellule permettant une nouvelle infection (**Fig. 5**). La première étape correspond à l'adsorption du phage sur son hôte bactérien. Elle peut être favorisée par la présence de certains cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). L'adsorption requiert la reconnaissance entre des récepteurs présents à la surface de la bactérie et des anti-récepteurs présents sur la particule virale. Une grande variété de composants de l'enveloppe peut servir de récepteurs chez les bactéries. Chez les bactéries à Gram<sup>-</sup>, ils correspondent à des protéines de surfaces, des lipopolysaccharides, des polysaccharides, des flagelles ou encore des pili (Rakhuba *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2012). Au sein d'une espèce, les différents phages connus peuvent utiliser des récepteurs différents. Ainsi, chez *Salmonella enterica*, des phages reconnaissant FhuA, TolC, BtuB, OmpC, l'antigène capsulaire Vi, le LPS et les flagelles ont été rapportés (pour revue, Shin *et al.*, 2012). Chez les bactéries à Gram<sup>+</sup>, les motifs polysaccharidiques sont souvent utilisés comme récepteurs, à l'exemple des phages infectant *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis*. Les acides teichoïques sont reconnus par des phages de *Lactobacillus delbrueckii* (Quiberoni *et al.*, 2000; Raisanen *et al.*, 2007; Ainsworth *et al.*, 2014).

#### 3.1. Cycle lytique

Le cycle lytique est caractéristique des bactériophages dit virulents. Ce type de phage prédomine en milieu aquatique.

Après adsorption et injection de l'ADN dans la cellule, l'expression de certains gènes précoces initient le cycle lytique. La réplication du génome phagique se fait par détournement de la machinerie de synthèse de la bactérie hôte. Les ADNs néosynthétisés sont ensuite introduits dans des capsides virales, préalablement assemblées. Les néo-virions sont formés par l'assemblage de la tête mature (capside et ADN) avec la partie caudale du phage. La lyse bactérienne et la libération des particules néoformées se font par hydrolyse de la membrane grâce à l'endolysine (ou lysine) phagique. La lysine est libérée dans le



compartiment pariétal, sur la couche de peptidoglycane, grâce à des pores formés par des oligomères d'une protéine appelée holine (Wang *et al.*, 2000; Young, 2014). Les virions sont libérés dans l'environnement et peuvent immédiatement initier un cycle infectieux sur un nouvel hôte.

Les expériences menées par Ellis et Delbrück ont permis de définir les paramètres caractérisant les différentes étapes de l'infection virale (Ellis & Delbruck, 1939). Il s'agit de la vitesse d'adsorption, de la période dite de latence, et enfin de la "burst size". La période de latence correspond au temps entre l'adsorption des phages et la libération de néo-particules par la lyse bactérienne tandis que la "burst size" définit la quantité de virions libérés pour chaque cellule infectée. Ces paramètres sont les déterminants du degré de virulence d'un phage donné. Toutefois ils peuvent varier selon l'état physiologique de la cellule, ou encore des paramètres environnementaux comme la température (Sillankorva *et al.*, 2004).

### **3.2. Cycle lysogénique**

Les phages tempérés sont capables d'effectuer un cycle alternatif au cycle lytique qui est la lysogénie (**Fig. 5**). Ils prédominent dans certains environnements comme les fécès.

Après son entrée dans la cellule, l'ADN d'un phage tempéré doit faire le choix entre deux modes de vie, le cycle lytique, ou le cycle lysogénique. Brièvement, la décision du cycle de vie est faite grâce à deux répresseurs phagiques  $C_I$  et  $Cro$  qui peuvent se lier à un opérateur nommé  $O_R$ . La protéine  $C_I$  favorise la lysogénie, en réprimant les gènes impliqués dans le cycle lytique, tandis que la protéine  $Cro$  permet la situation inverse. La décision lyse/lysogénie est donc fonction du ratio entre ces deux protéines. Une fois le choix de la lysogénie faite, l'ADN viral est intégré au génome de son hôte. Il sera répliqué comme partie intégrante du génome bactérien et transmis verticalement aux nouvelles générations bactériennes. La bactérie est devenue "lysogène" et le phage est appelé "prophage". La lysogénie est maintenue grâce à l'expression du répresseur  $C_I$ . Cet état a pour conséquence directe l'immunisation de la bactérie lysogène vis-à-vis de tout phage virulent, ou tempéré, munis d'un répresseur homologue.





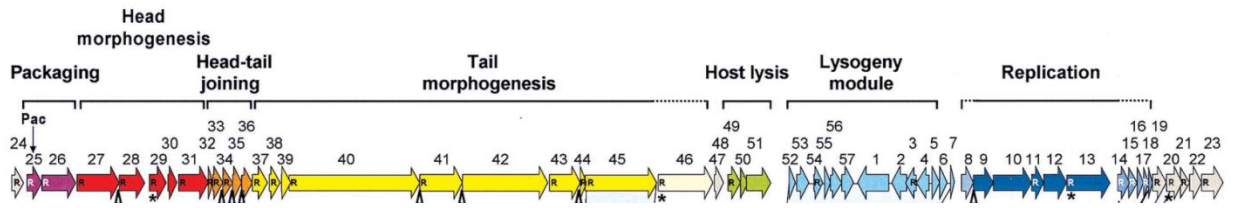
L'intégration requiert l'action de l'intégrase phagique qui assure la recombinaison site spécifique entre deux séquences identiques sur le génome viral (*attP*), et bactérien (*attB*). Elle permet également l'excision de l'ADN du phage, avec d'autres facteurs. Les intégrases sont regroupées en deux grandes familles selon le site catalytique utilisé, à tyrosine ou à sérine. Les premières sont à même de reconnaître de longues séquences d'ADN et requièrent l'action d'autres protéines phagiques ou bactériennes, tandis que les intégrases à sérine reconnaissent des séquences *attB* plus courtes, et fonctionnent indépendamment de tout autre protéine (Fogg *et al.*, 2014).

Le prophage est dit actif lorsqu'il est capable de basculer vers un cycle lytique, et produire des virions. Plusieurs composés chimiques peuvent induire l'excision des prophages, au travers d'une réponse SOS et/ou la formation d'espèces réactives de l'oxygène (mitomycine C, UV, ciprofloxacine, thrimetoprime, ampicilline, fluoroquinolone, peroxyde d'hydrogène). L'application de différentes températures peut également induire l'excision. Dans le cas d'induction de souches poly-lysogènes, on assiste souvent à une forme de compétition entre les différents prophages dans la cellule. Le temps nécessaire à la formation et à la libération de particules de chaque prophage peut être différent. Le temps de « maturation intra-cellulaire » devient un paramètre déterminant, car c'est le prophage ayant le temps le plus court qui aura un avantage sur les autres (Refardt, 2011). Des cas de répressions de l'induction entre les différents prophages de *Enterococcus faecalis* ont été décrits (Matos *et al.*, 2013).

Il y a souvent un taux d'excision spontanée dans les cultures de bactéries lysogènes. Parfois aussi, la lysogénie se traduit par la présence d'un prophage qui alterne un état intégré et un état libre. Ainsi, chez *S. pyogenes*, le prophage SF370.4 est intégré entre les gènes *mutS* et *mutL*. La dynamique d'intégration/excision module le phénotype hypermutateur en fonction de la phase de croissance (Scott *et al.*, 2008).

### 3.3. Cycle pseudo-lysogénique

La pseudolysogénie peut être définie comme étant un état intermédiaire entre la lysogénie et le cycle lytique. L'ADN phagique reste intact (linéaire ou circulaire) à l'intérieur



**Figure 6. Organisation modulaire typique des gènes phagiques chez les Firmicutes (adaptée de Lucchini *et al.*, 1999).**

de la cellule, sans se répliquer (cycle lytique), ni s'intégrer dans le chromosome (lysogénie). Contrairement à la lysogénie, où le maintien du prophage est lié à l'action du répresseur phagique, et est réversible par un stress environnemental, la pseudolysogénie correspond à un état figé mais potentiellement productif du développement phagique (Ripp & Miller, 1997). Ce phénomène est souvent observé dans les conditions environnementales naturelles des bactéries, où elles font souvent face à un épuisement des nutriments. Il est considéré comme une stratégie de survie des bactériophages dans leur milieu naturel (Ripp & Miller, 1998; Łoś & Węgrzyn, 2012). Chez le bactériophage virulent T4 d'*E. coli*, cette stratégie est utilisée lors d'un ralentissement, ou d'une inhibition complète de la croissance de l'hôte (Los *et al.*, 2003). Cette forme libre du génome phagique dans le cytoplasme peut être perdue lors de la division cellulaire (**Fig. 5**).

## 4. Organisation et évolution des génomes

### 4.1. Organisation modulaire

L'organisation modulaire du génome des bactériophages a été évoquée pour la première fois grâce à la cartographie par hétéroduplex de génomes des phages lambdoïdes (Simon *et al.*, 1971). Dans ces génomes, l'ordre des gènes est conservé et les gènes sont organisés en modules fonctionnels. Certains de ces gènes sont homologues, d'autres pas. Une structure mosaïque a été trouvée lors de la comparaison des génomes deux à deux. Cette idée d'organisation en modules fonctionnels, s'est peu à peu généralisée et a été confirmée grâce à l'accès aux génomes phagiques/prophagiques. Elle a ainsi été décrite chez les phages virulents d'*E. coli*, les mycobactériophages ou encore les phages de *Streptococcus thermophilus* (Monod *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999a). Chez les phages de Firmicutes, les différents gènes sont regroupés selon leur fonction dans le module de lysogénie, de répllication de l'ADN, d'empaquetage de l'ADN, de morphogénèse de la tête et de la partie caudale et enfin le module de lyse (**Fig. 6**).



## 4.2. Evolution des génomes viraux

L'étude de l'organisation modulaire des bactériophages est à l'origine de l'une des théories de l'évolution des génomes phagiques. Il s'agit de la théorie des modules, proposée pour la première fois en 1980 par Boststein (Botstein, 1980). La théorie propose que le produit de l'évolution ne soit pas un virus donné, mais plutôt un mélange d'éléments génétiques (modules) interchangeable, ayant une fonction biologique définie. Des modules assurant la même fonction peuvent alors être échangés par recombinaison chez des phages similaires, ayant une même organisation modulaire. La théorie de l'évolution des modules est soutenue par différentes études de génomiques comparatives chez des phages infectant des bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> (Canchaya *et al.*, 2003). La recombinaison homologue entre des modules flanqués par des séquences conservées aux extrémités a été proposée pour les phages lambdoïdes (Juhala *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2001). Le modèle alternatif de cette évolution est une recombinaison illégitime, répandue sur tout le génome phagique, et opérant positivement pour la sélection de phages fonctionnels (Juhala *et al.*, 2000). Récemment il a été proposé que les échanges de gènes entre phages tempérés sont majoritairement catalysés par des recombinases virales (De Paepe *et al.*, 2014). Bobay *et al.* (2014) ont quant à eux établi que la structure des phages dépend de leur aptitude à coder leurs propres enzymes de recombinaison ou à manipuler l'équipement correspondant de leur hôte. L'aspect mosaïque est plus important chez les phages ayant leur propre recombinase et ils ont un répertoire de gènes plus divers (Bobay *et al.*, 2013).

La théorie de l'évolution verticale des génomes phagiques vient s'ajouter aux éléments précédents. La diversification des modules est complétée par des événements de délétions, de mutations, et d'acquisition de nouveaux gènes. La théorie des modules apporte une certaine compréhension des modalités d'acquisition de gènes phagiques, mais elle n'explique cependant pas la présence de gènes d'origine non virale. L'ensemble de ces gènes forment ce qu'on appelle communément les "morons", pour « more on » (Hendrix, 2002). Il s'agit de gènes dont la transcription est autonome et indépendante. Les fonctions codées ne sont pas indispensables à l'infection virale, mais confèrent un avantage adaptatif aux phages, ou aux souches lysogènes (Juhala *et al.*, 2000; Cumby *et al.*, 2012). Les morons sont fréquemment trouvés sur des phages tempérés. Lorsque les gènes fournissent un avantage sélectif à l'hôte, on parle de conversion lysogénique (Brussow *et al.*, 2004). Les morons sont



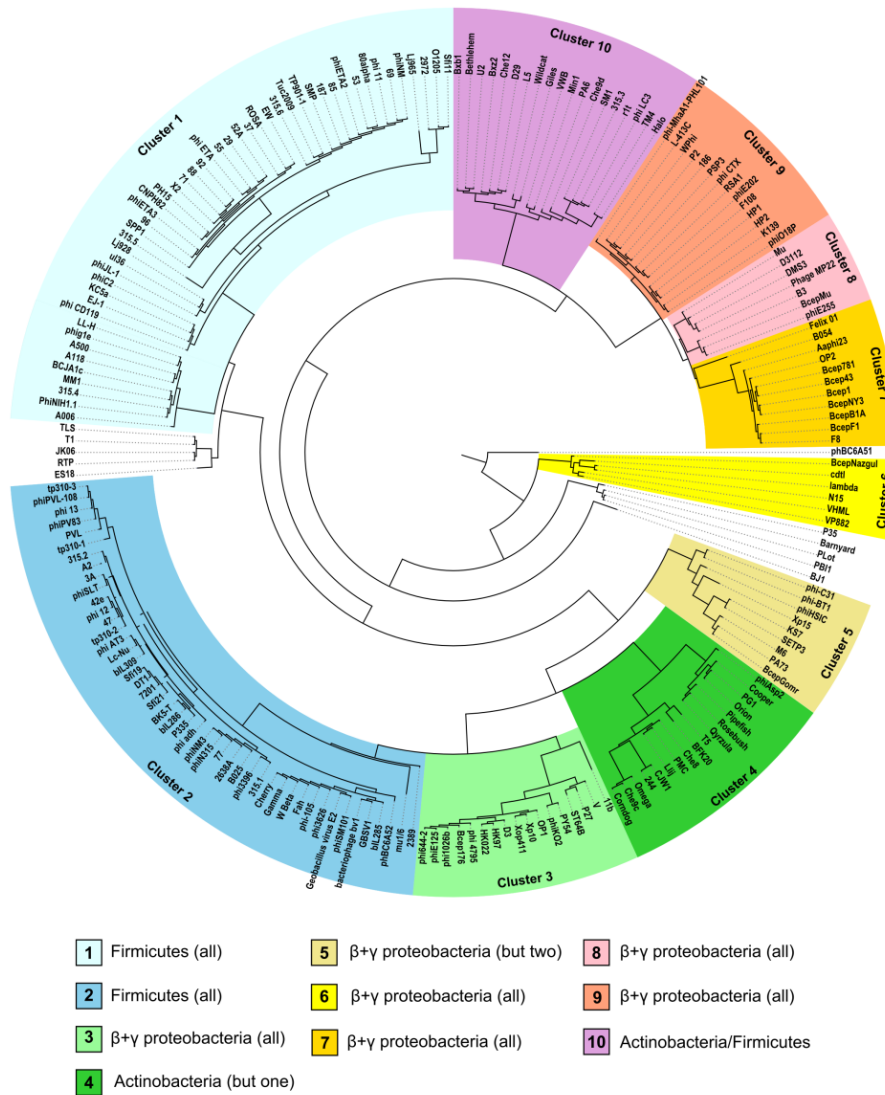
facilement identifiables en comparant les génomes phagiques, car ils interrompent la synténie : les morons sont entourés de deux gènes phagiques, qui sont contigus sur un autre génome viral. Ils représentent donc souvent des séquences variables, phage ou souche-spécifique. Par ailleurs, ils possèdent un pourcentage en GC différent de celui du reste du génome phagique. Leur mode d'acquisition reste très hypothétique, et serait basé sur des événements de transfert horizontal (Canchaya *et al.*, 2003).

Dans le génome bactérien, le prophage doit trouver un certain équilibre avec son hôte. Cet équilibre commence avec le choix du site d'intégration, qui doit minimiser au maximum les effets négatifs sur l'organisation du génome de l'hôte (Bobay *et al.*, 2013). A titre d'exemple, les gènes de tRNA et de tmRNA sont souvent ciblés pour l'intégration des phages (Williams, 2002). Toutefois, les sites de tRNA les plus exprimés sont rarement utilisés pour assurer une stabilité maximale de la lysogénie (Bobay *et al.*, 2013). Les prophages actifs peuvent à tout moment s'exciser, provoquer la lyse de leur hôte et infecter une autre bactérie. Très récemment il a été montré qu'au fil de l'évolution, les bactéries ont su domestiquer leurs prophages (Bobay *et al.*, 2014). Ainsi, les prophages peuvent subir des délétions plus ou moins grandes de leur génome, tout en conservant les gènes pouvant conférer une capacité d'adaptation à son hôte. Les prophages devenant ainsi défectifs sont transmis verticalement dans la population. L'importance de ces délétions chez certains prophages peut provoquer une perte quasi-totale du génome viral, ce qui rend difficile leur identification *in-silico* lors de la recherche de séquences virales dans les génomes bactériens (Canchaya *et al.*, 2003).

## 5. Nouvelles propositions de classification

L'avancée des techniques de séquençage et le développement d'approches métagénomiques ont fait naître l'idée d'une classification possible à partir des séquences génomiques phagiques. Le passage par la méthode traditionnelle d'isolement, et de production de lysats concentrés afin de réaliser l'observation des particules en microscopie ne serait alors plus nécessaire. Il n'existe pas de séquences universelles conservées dans les





**Figure 7. Classification des bactériophages.** Les bactériophages sont classés en 4 types de « neck » distincts. Le type 1 est présenté (Guerois *et al.*, Poster 161, VOM 2014).

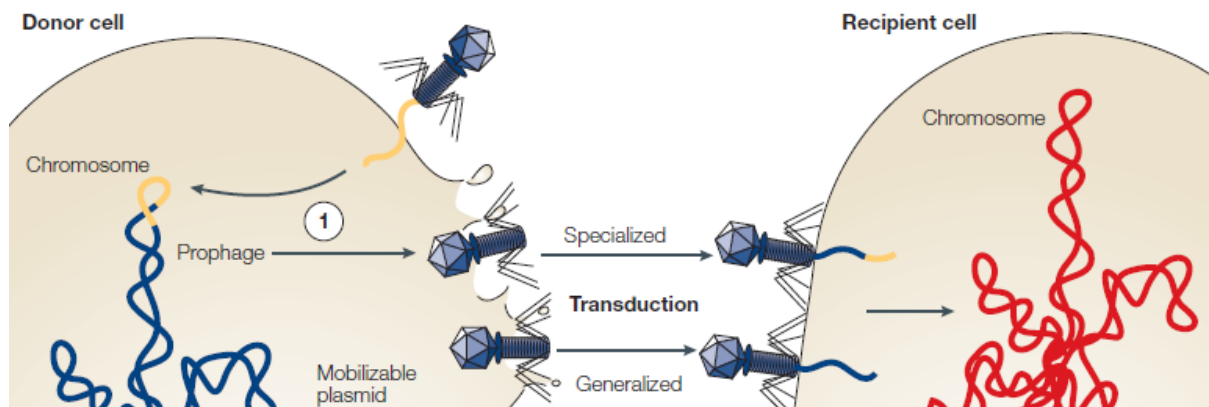
génomés phagiques, à l'image des séquences conservées associées au gène codant l'ARNr16S chez les bactéries. Une première classification des phages sur la base de la séquence d'un gène situé dans le module structural (morphogénèse de la tête ou de la partie caudale) a été proposée par Proux *et al.* (2002). Malgré ces efforts, les *Siphoviridae* ont été classés en quatre groupes. Smith *et al.* (2013) ont retenu le gène *tmp* (Tape Measure Protein). L'analyse comparative de ce seul gène reconstitue parfaitement les groupes et sous-groupes établis à partir des comparaisons des génomes complets de mycobactériophages.

Un autre système de classification a été proposé (Rohwer & Edwards, 2002). Il s'agit d'un arbre protéomique de 105 génomes complets de bactériophages, généré *in-silico* et qui reflète relativement la classification adoptée par l'ICTV. Enfin, une stratégie plus réduite est proposée par l'équipe de Marie-Agnès Petit à l'INRA afin de classer les phages caudés. Elle s'appuie sur l'identification de huit gènes du module de la morphogénèse de la tête et de la partie caudale (Guerois, poster 161, Congrès Viruses of Microbes, Zurich, 2014). La classification dans ce système tient compte de la distance entre les différents gènes, ainsi que de la similarité entre les protéines phagiques et le contenu disponible dans la base de données Aclame. Un total de 2007 génomes phagiques sont actuellement disponibles dans la base (interrogation réalisée en octobre 2014, <http://aclame.ulb.ac.be/>) (Fig. 7).

## 6. Relations entre les phages et leurs hôtes dans les écosystèmes

### 6.1. Les phages sont des agents de transfert de gènes par transduction

Les transferts horizontaux sont un moyen d'échanges de matériel génétique chez les bactéries. Les bactériophages y jouent un rôle très important par le mécanisme de transduction. Il existe deux types de transduction : généralisée ou spécialisée (Fig. 8). On estime qu'il y aurait dans les océans jusqu'à  $2 \times 10^{16}$  événements de transduction par seconde (Canchaya *et al.*, 2003).



**Figure 8. Le transfert de matériel génétique médié par les bactériophages.**

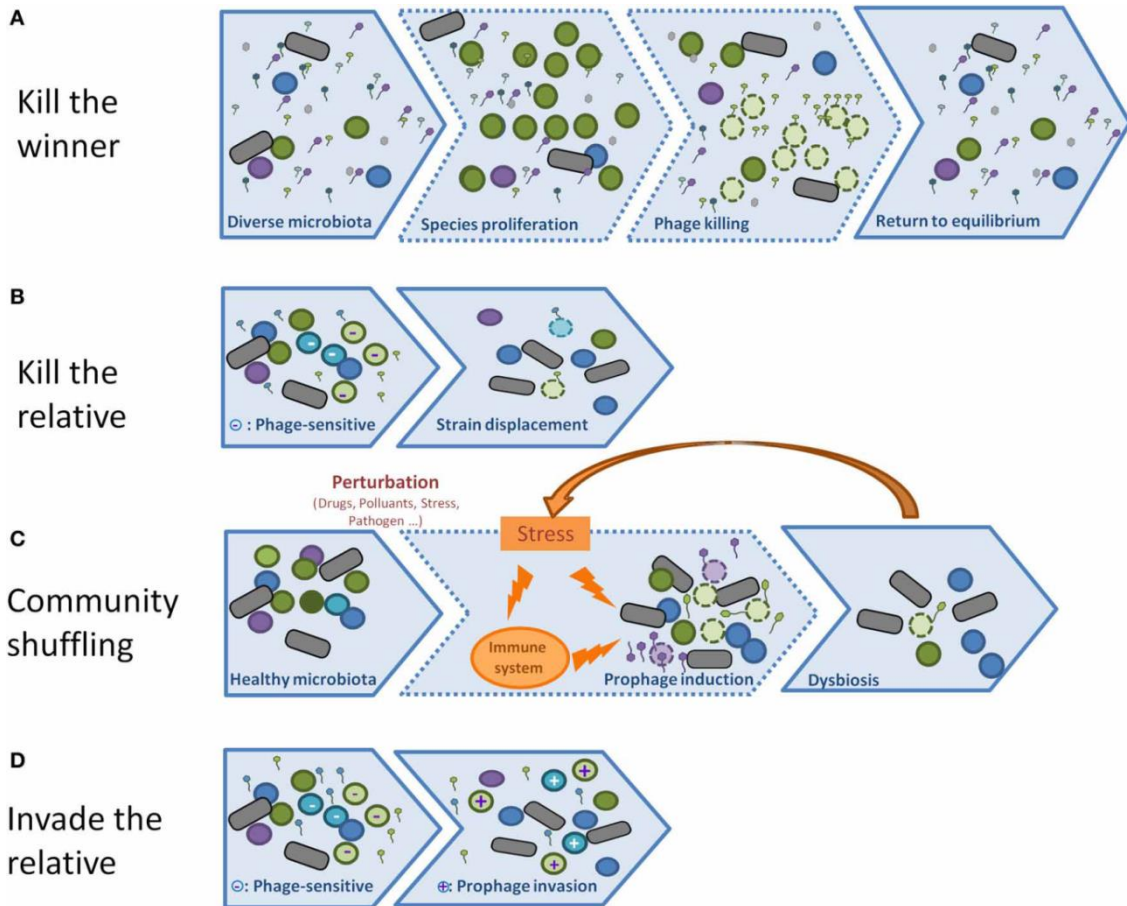
**La transduction généralisée:** le bactériophage peut encapsider par erreur un fragment du génome bactérien durant son cycle lytique. *Via* l'infection d'un nouvel hôte, le phage pourra transmettre ce matériel génétique sans lyse. Tous les gènes de l'hôte peuvent être transmis par ce mécanisme. **La transduction spécialisée:** ce mode de transduction fait suite à une erreur d'excision d'un prophage, qui aura donc un fragment d'ADN de son hôte. Lors d'un nouveau cycle lysogénique, le nouvel hôte recevra une copie du gène transduit par le phage. Seuls les gènes avoisinant le site d'insertion du prophage sont concernés par ce mode de transduction (Frost *et al.*, 2005).

Lors de la transduction généralisée, le bactériophage (tempéré ou lytique) lors de son cycle infectieux peut encapsider accidentellement un fragment d'ADN bactérien (bactérie donneuse) qui sera alors transmis à une autre bactérie susceptible (bactérie receveuse) lors de son infection. L'ADN transmis peut se retrouver à l'état de plasmide, ou s'intégrer dans le chromosome de l'hôte. N'importe quel fragment d'ADN de l'hôte peut être transduit.

La transduction spécialisée est le fait des phages tempérés. Elle concerne uniquement les gènes bordant les sites d'attachement des prophages dans le génome bactérien, et est le résultat d'une erreur d'excision d'un prophage. Le phage transducteur possède un génome modifié, caractérisé par la perte d'une portion de séquence sur une extrémité, et l'acquisition d'une séquence d'origine bactérienne à l'extrémité opposée. Dans le cas où les gènes prophagiques perdus ne sont pas essentiels à la formation de virions, des particules infectieuses sont produites après excision. Dans le cas contraire, le génome phagique restera à l'intérieur de la cellule en tant que plasmide répliatif (Miller & Day, 2004). Le cas le plus connu est celui du phage Lambda qui en s'induisant peut encapsider le génome phagique et aussi bactérien, notamment les gènes *gal* et *bio* qui flanquent le site d'insertion du phage (Sato & Campbell, 1970; Griffiths *et al.*, 2000).

## **6.2. La présence de phages modifie les équilibres entre bactéries dans les écosystèmes**

Le développement de la métagénomique a permis la description de la fraction virale de nombreux écosystèmes, appelée communément "virome", et a démontré l'importance et la prévalence des bactériophages. Plusieurs descriptions des viromes humains ont été publiées : tractus gastro-intestinal, peau, salive et même le lait maternel (Foulongne *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2013; Pride *et al.*, 2012; Barr, 2014). Il existe un intérêt grandissant pour le rôle des bactériophages dans la dysbiose des microbiotes humains, et les phages sont considérés comme des marqueurs potentiels utiles dans le suivi de la santé de l'homme (Dalmaso *et al.*, 2014).



**Figure 9. Différentes théories sur le rôle joué par les bactériophages dans un écosystème (d'après De Paepe *et al.*, 2014).**

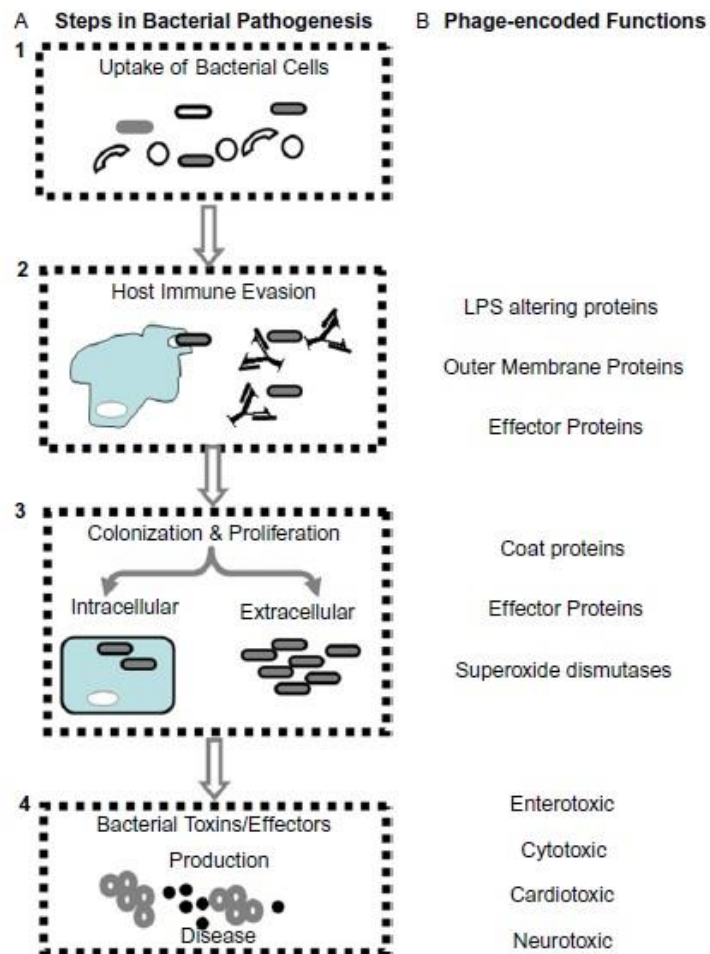
Les bactériophages par leurs différents styles de vie (lytique ou tempéré) peuvent influencer le microbiote environnant selon plusieurs modalités (De Paepe *et al.*, 2014) (**Fig. 9**).

- *La théorie « Kill the winner »*: dans ce modèle d'interaction, l'émergence d'une population bactérienne adaptée ("winner") est suivie par l'émergence d'un phage prédateur de cette population (Thingstad, 2000). Cette théorie implique que les phages virulents inhibent spécifiquement certaines bactéries afin de conserver un équilibre dans la diversité du microbiote.

- *Kill the relative* : ce second modèle traduit la capacité de la bactérie lysogène à induire son prophage pour l'utiliser comme arme afin d'inhiber les bactéries compétitrices sensibles (Bossi *et al.*, 2003). Cette stratégie procure un avantage à la bactérie lysogène en éliminant les compétiteurs. C'est le cas de *E. faecalis* V583 qui peut induire le phage  $\phi$ V1/7 (Duerkop *et al.*, 2012). Cependant, la capacité lytique des phages tempérés est limitée. En effet, il a été montré que chez des souches d'*E. coli* lysogènes pour le phage  $\lambda$  et non lysogènes, cet effet destructeur de l'induction n'est que temporaire (Gama *et al.*, 2013). A long terme, les phages de nature tempérée vont lysogéniser la bactérie sensible, ce qui leur confère une résistance aux phages.

- *Shuffling the community* : une induction des prophages est provoquée par des modifications de l'environnement (drogue, polluants, stress, présence de pathogènes ...). La lyse massive de la population lysogène provoque une dysbiose. A titre d'exemple, l'induction des prophages d'*Enterococcus faecalis*, et de *Clostridium difficile* en présence d'une dose non-létale d'antibiotiques a été démontrée (Meessen-Pinard *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013). Dans le tractus gastro-intestinal, la dysbiose pourrait être source de pathologies.

- *Invade the relative* : dans ce modèle, les phages tempérés infectent les cellules hôtes sans induire leur lyse. Ce modèle évoque donc la transmission de prophages de cellule à cellule. L'acquisition de prophages confère un avantage sélectif par rapport aux souches non-lysogènes.



**Figure 10. Rôle de composés phagiques dans la pathologie bactérienne.**

(A) Les différentes étapes d'une infection bactérienne de la colonisation à la virulence. (B) La colonne de droite décrit les différentes fonctions attribuées aux prophages à chaque étape de l'infection. (A<sub>1</sub>) la bactérie peut se retrouver dans son hôte par différentes voies (nasale, orale, urogénitale); (A<sub>2</sub>) la bactérie peut échapper au système immunitaire par différentes stratégies grâce à des fonctions prophagiques; (A<sub>3</sub>) pour la réussite de l'infection, la bactérie doit coloniser son nouvel environnement tout en se protégeant des agressions externes, certaines de ces fonctions sont prophagiques (colonne de droite); (A<sub>4</sub>) Les toxines bactériennes dont la plupart sont codées sur les prophages sont produites et déclenchent les premiers symptômes de la pathologie (Boyd, 2012).

### 6.3. La lysogénie, un mécanisme d'acquisition de capacités d'adaptation (fitness)

La lysogénie est fréquente chez les bactéries. Chez *E. coli*, les gènes prophagiques peuvent constituer jusqu'à 14 % du génome. Chez *S. pneumoniae*, une analyse de 336 génomes montrent que 86 % des souches contiennent un prophage, complet ou non (Harrold, van Tonder, Brueggemann, poster 27, VoM 2014).

L'intégration des prophages dans le génome bactérien peut avoir un profond retentissement dans la cellule. Les prophages jouent le rôle d'ancrage pour des réarrangements géniques. Ils peuvent interrompre les gènes situés au niveau du site d'attachement utilisé pour l'intégration site-spécifique. Ils confèrent l'immunité aux phages homologues, lysent les compétiteurs, introduisent des facteurs positifs pour l'hôte bactérien, ou encore répriment des gènes bactériens grâce à des répresseurs codés par le génome prophagique.

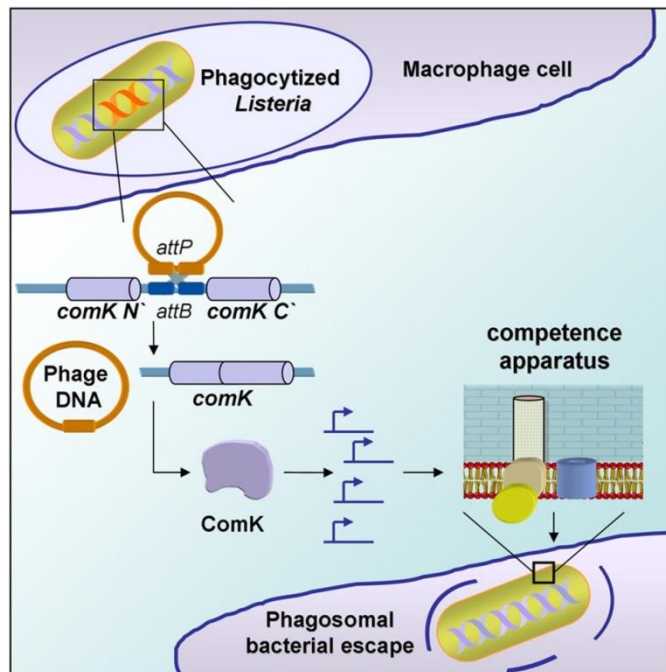
#### 6.3.1. Virulence

Dans le cas des infections bactériennes, la première étape de l'infection sera la pénétration de la bactérie dans son hôte (**Fig. 10**). Une fois cette étape passée, la bactérie doit atteindre son site de prolifération, échapper au système immunitaire et élaborer sa toxine (si elle en produit). Différentes fonctions associées à ces étapes peuvent être codées par un prophage (Boyd, 2012).

Chez de nombreux pathogènes à Gram<sup>-</sup>, la virulence repose sur la présence d'un système de sécrétion de type 3 (T3SSs) assurant l'injection des protéines effectrices directement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Coburn *et al.*, 2007; Dean, 2011). Chez la souche entérohémorragique *E. coli* O157:H7, certaines de ces protéines effectrices sont codées par des loci situés sur des prophages de type lambdaïdes (Tobe *et al.*, 2006).

Une fois dans la cellule hôte, les bactéries ont développé une panoplie de stratégies pour survivre aux conditions du milieu (stress oxydatif, réponse immunitaire). La bactérie *Salmonella enterica* peut se protéger du stress oxydatif grâce à un gène codant une





**Figure 11. Mécanisme de virulence chez *Listeria monocytogenes*.** L'excision du prophage est induite lors de la phagocytose de *L. monocytogenes*, ce qui rétablit la fonctionnalité du gène *comK* et permettant ainsi à la bactérie de s'échapper du phagosome (Rabinovich *et al.*, 2012).

superoxyde dismutase présent sur les prophages Gifsy-2 et Fels-1 (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Cependant les pathogènes qui sont piégés par le système immunitaire de l'hôte doivent s'échapper pour pouvoir survivre. L'intégration d'un prophage peut parfois inactiver un gène, qui est reconstitué lors de l'excision. Ce cas est présent chez *Listeria monocytogenes*, où un système opérationnel de fixation de l'ADN extracellulaire (compétence) est une condition nécessaire pour s'échapper du phagosome d'un macrophage (**Fig. 11**). Chez des bactéries lysogènes, ce système est inactif dû à l'intégration du prophage dans le gène *comK*, un composant nécessaire pour rendre le système effectif (Molloy, 2012). L'excision du prophage (sans former de virions) permet la sortie de la bactérie du phagosome.

La production de toxine est le cas classique d'une conversion lysogénique chez les pathogènes (Fortier & Sekulovic, 2013). Ces cas incluent certaines toxines bactériennes parmi les plus puissantes, comme les neurotoxines de type C et de type D de *Clostridium botulinum* (Eklund *et al.*, 1971, 1972). Les shiga-toxines, produites par plusieurs groupes de bactéries (*E. coli*, *Shigella dysenteriae* type I) sont responsables de colites hémorragiques ou encore d'épidémies de syndrome hémolytique. Ces toxines sont présentes sur des phages tempérés pouvant être retrouvés un peu partout (eaux usées, aliments, selles) favorisant ainsi l'émergence de nouvelles souches pathogènes (Herold *et al.*, 2004; Martinez-Castillo & Muniesa, 2014). L'agent responsable du choléra, *Vibrio cholerae* produit une entérotoxine puissante provoquant une déshydratation rapide du malade accompagnée d'une diarrhée. L'opéron de cette toxine réside dans le génome du prophage filamenteux CTX $\phi$  (Waldor & Mekalanos, 1996).

### 6.3.2. Fitness

La plupart des bactéries ont su développer des stratégies pour survivre à un environnement hostile, coloniser un milieu ou encore lutter contre la raréfaction de nutriments grâce aux bactériophages (Hargreaves *et al.*, 2014). La formation de biofilm est un moyen de colonisation efficace utilisée par les bactéries pour survivre dans un environnement hostile (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Bjarnsholt, 2013). L'ADN extracellulaire joue un rôle clé dans l'établissement des biofilms en leur conférant plus de stabilité



(Whitchurch *et al.*, 2002). Cet ADN extracellulaire est fourni par l'induction spontanée (excision de prophage) de la mort cellulaire d'une fraction de la population chez *Streptococcus pneumoniae*. Cette forme d'altruisme permet la formation d'un biofilm plus robuste (Carrolo *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, le gène *pckA*, un gène impliqué dans la glucogénèse, est directement sous le contrôle du répresseur CI (maintien de la lysogénie). La fixation de CI sur la région de régulation du gène arrête la transcription de *pckA*, ce qui induit un ralentissement de la croissance dans un environnement pauvre en nutriments (Chen *et al.*, 2005). La stratégie est adoptée par les lysogènes afin de survivre à la réponse immunitaire, qui cible préférentiellement les bactéries plus proliférantes. Les bactéries marines sont souvent confrontées à des conditions défavorables de croissance dans leur milieu naturel. Une étude sur leurs prophages conforte les travaux de Chen et collaborateurs (Paul, 2008).

## 7. Applications dans la lutte contre les microorganismes

### 7.1. La phagothérapie

La phagothérapie chez l'humain a toujours été utilisée dans les pays de l'Europe de l'Est et en Russie. En France, des préparations de phages ont été commercialisées jusqu'aux années 1990 par l'Institut Pasteur. Actuellement, des médecins pratiquent encore la phagothérapie et s'approvisionnent en Géorgie (Kutter *et al.*, 2010). L'utilisation de cocktails de phages virulents semble être plus efficace qu'un seul phage. De plus, la voie d'administration est un facteur important, car pour faire son effet, les phages doivent parvenir actifs, et en concentration suffisante, au niveau de leur site d'action.

De nombreux cas de traitements réussis après échec d'une antibiothérapie peuvent être énumérés, notamment lors d'infections à *Staphylococcus* sur des brûlures et des plaies (Stone, 2002; Kutateladze & Adamia, 2008). Dublanchet et son équipe ont rapporté le succès d'un traitement d'une otite externe chronique à *S. aureus* chez une patiente chez laquelle l'antibiothérapie a été inefficace (Dublanchet, 2008). L'application locale de phages



actifs *in vitro* sur le germe isolé a été associée à un antibiotique. Une durée de 48 h a suffi pour observer une nette amélioration.

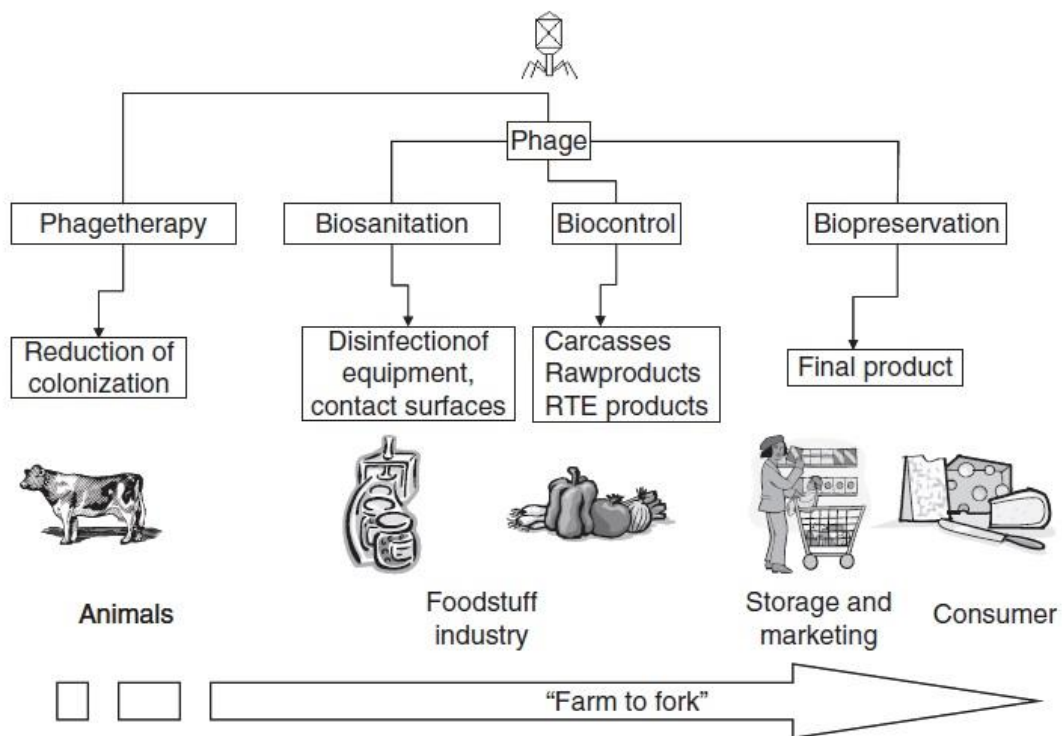
Un patch pour traiter les infections des plaies, le "Phagobioderm" a été développé et commercialisé en Géorgie (Markoishvili *et al.*, 2002). Ce patch biodégradable est imprégné de pyophages (actifs contre *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*) et d'autres composants anti-microbiens.

Les bactériophages peuvent aussi avoir un effet modulateur sur le système immunitaire et leur utilisation est proposée lors de transplantation afin d'augmenter la tolérance mais aussi lutter contre les infections (Górski *et al.*, 2006).

Cependant, la phagothérapie présente ses limites malgré les résultats positifs obtenus chez les animaux et chez l'homme. Parmi ses contraintes, on peut citer le développement de résistance des bactéries aux phages, ainsi que la pharmacocinétique encore très mal connue des phages (possibilité de réactions immunitaires) et la capture et/ou transfert de toxines bactériennes (Projan, 2004). Une meilleure connaissance de la biologie des phages et de leurs interactions avec les bactéries, ainsi que l'augmentation des essais cliniques sont nécessaires pour le futur développement de la phagothérapie (Nilsson, 2014). La réalisation de telles études cliniques demeure encore un problème majeur en raison des différentes législations sur l'utilisation des bactériophages en médecine (Brüssow, 2012; Verbeken *et al.*, 2014).

## 7.2. Bactériophages et sécurité alimentaire

Un ensemble de 1288 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) ont été déclarés en France en 2012, et ont affecté 10258 personnes, dont six suivis de décès (Données Tiac 2012 – InVS). Les agents responsables les plus fréquents sont l'entérotoxine staphylococcique (29 %), *Bacillus cereus* (21 %) et *Salmonella* (19 %). Ces bactéries sont des pathogènes environnementaux, qui peuvent contaminer les aliments au cours de leur production, ou peuvent déjà être présentes naturellement au sein de la flore intestinale des animaux (Sulakvelidze & Barrow, 2004).



**Figure 12. Utilisation des phages en sécurité alimentaire.** Tout au long du processus de production alimentaire, les phages sont utilisables : **(i)** la phagothérapie animale peut être utilisée afin de réduire ou éliminer le pathogène chez l'animal ; **(ii)** l'élimination directe des pathogènes ou bactéries d'altération est possible par l'application de suspensions de phages ; **(iii)** les cocktails phagiques sont également utilisés comme additifs alimentaires pour la stabilité microbologique des produits (García *et al.*, 2008).

La phagothérapie est une approche qui participe à la prévention vis-à-vis des bactéries pathogènes tout au long de la chaîne alimentaire, des matières premières aux produits finis (**Fig. 12**). Différents critères sont préconisés. L'utilisation de cocktails de phages virulents (burst size élevé et phase de latence courte), dont le génome est séquencé, est recherchée. La mise à disposition des séquences permet d'assurer qu'aucun gène de conversion lysogénique, ou de toxine, n'est produit par le phage.

Le contrôle des pathogènes par les bactériophages directement au niveau de l'animal encore vivant a été proposé. Cependant, les variations et la complexité du microenvironnement du tube digestif de l'animal vivant réduisent l'efficacité des phages. Le traitement direct après abattage, ou sur les produits finis, a montré des résultats plus prometteurs. En effet, les conditions présentes dans les usines de transformation (température de stockage, la matrice alimentaire) limitent la croissance des bactéries qui est une étape nécessaire pour l'apparition de clones résistants aux phages (Sharma, 2013). Ainsi le traitement de peau de porc par un cocktail de phages actifs contre différents sérotypes de *Salmonella enterica* peut constituer un moyen pour réduire la contamination après abattage. L'application du cocktail à une MOI  $\geq 10$  ("Multiplicity of infection") sur une peau de porc contaminée expérimentalement par *Salmonella Typhimurium* U288 permet une réduction de la population de 99 % à 4 °C pendant 96 h (Hooton *et al.*, 2011).

L'utilisation du Listex™ P100 ([www.listex.eu](http://www.listex.eu)) permet le contrôle de *L. monocytogenes* sur la viande, le poisson, le fromage et d'autres produits alimentaires. Il s'agit de la première préparation de phages à avoir obtenu le statut GRAS ("Generally Recognised As Safe") (Soni & Nannapaneni, 2010; Oliveira *et al.*, 2014). De nombreux efforts visant à améliorer les formulations sont déployés (liquide, spray-dried ou nano-emulsions). Très récemment, l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a publié un avis plutôt favorable à l'utilisation du Listex™ P100 en France et reconnaît l'utilité de ces outils dans une approche "hurdle" (PEF "polyethylene furanoate", HHP "high hydrostatic pressure", "edible packaging"). L'agence insiste néanmoins sur (i) la définition au cas par cas de la concentration à appliquer, (ii) l'inefficacité de la stratégie en cas de recontamination des aliments, les phages étant adsorbés sur les matrices alimentaires, (iii) et la nécessité de connaître la persistance des phages dans le process et vis-à-vis de la désinfection.





Au-delà de leur utilisation pour contrôler les contaminations bactériennes, les bactériophages sont proposés en tant qu'outils de détection de pathogènes dans l'industrie alimentaire (Schmelcher & Loessner, 2014). En effet plus tôt un pathogène est détecté, plus l'industriel disposera d'une marge de manœuvre pour endiguer la contamination et prendre les mesures adéquates afin de garantir la sécurité du consommateur. Les phages sont utilisés pour leur spécificité d'hôte, leur faible coût et facilité de production, ainsi que leur pouvoir de distinction entre une cellule vivante et une cellule morte. Toutes les étapes de multiplication des phages peuvent être exploitées dans ce but, de l'adsorption à la lyse ; et des phages modifiés génétiquement ou non en sont les outils. Le *FAST-PlaquesTB*<sup>TM</sup> commercialisé par la société Biotec ([www.biotec.com](http://www.biotec.com)) est un outil à base de phages spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* pour sa détection dans le crachat (Muzaffar *et al.*, 2002). Le principe de détection repose sur l'amplification des phages ayant trouvé un hôte sur un tapis bactérien de souche sensible. Cette technique a été couplée avec une PCR spécifique de plusieurs espèces de *Mycobacterium*. La stratégie a permis l'utilisation du *FAST-PlaquesTB*<sup>TM</sup> sur d'autres types d'échantillons (Stanley *et al.*, 2007). Ainsi, la détection de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, agent de la paratuberculose dans le lait et le fromage est devenu possible avec cette technique (Botsaris *et al.*, 2010).



## **Partie III :**

### **Lutte contre les phages en industrie agro-alimentaire**

**Tableau III. Taxonomie actuelle des bactériophages de bactéries lactiques (Mahony *et al.*, 2014).**

Host	Phage family	Phage species	No. of fully sequenced members	Taxonomy reference(s)	
<i>L. lactis</i>	<i>Siphoviridae</i>	936	51	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		P335	15	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		c2	2	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		1358	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		Q54	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		P087	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		1706	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		949	2	Deveau <i>et al.</i> , 2006	
		<i>Podoviridae</i>	P034	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006
			KSY1	1	Deveau <i>et al.</i> , 2006
<i>S. thermophilus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>cos</i>	6	Le Marrec <i>et al.</i> , 1997	
		<i>pac</i>	6	Le Marrec <i>et al.</i> , 1997	
		5093-like	1	Mills <i>et al.</i> , 2011	
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Siphoviridae</i>	Group Ia and b	2	Ali <i>et al.</i> , 2013	
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	<i>Siphoviridae</i>	Group IIa–d	2	Ali <i>et al.</i> , 2013	
<i>Lb. brevis</i>	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Deasy <i>et al.</i> , 2011; Jang <i>et al.</i> , 2011	
<i>Lb. casei</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	6	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	2	Yoon and Chang, 2011; Zhang <i>et al.</i> , 2011	
<i>Lb. gasserii</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Zago <i>et al.</i> , 2013	
<i>Lb. paracasei</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	2	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Alemayehu <i>et al.</i> , 2009	
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	5	Villion and Moineau, 2009	
	<i>Myoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Villion and Moineau, 2009	
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Siphoviridae</i>	Unnamed	1	Ehrmann <i>et al.</i> , 2013	

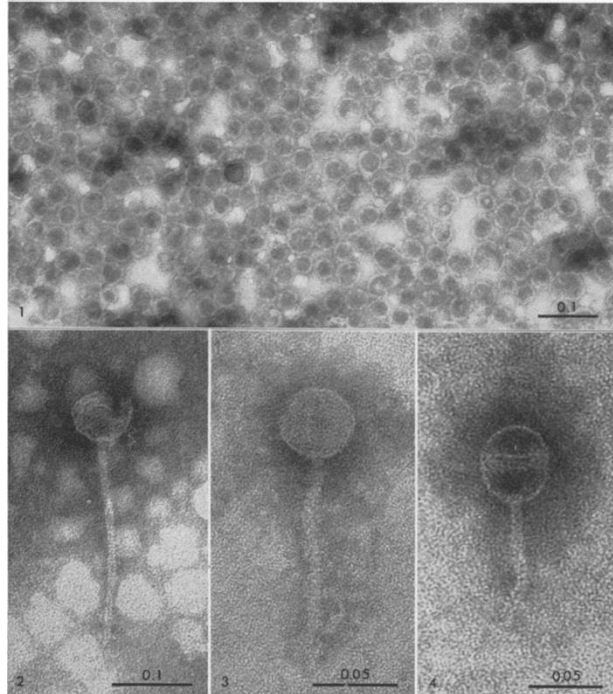
# 1. Les phages des BL

## 1.1. Généralités

Les genres/espèces de BL les plus utilisées dans les industries agro-alimentaires (IAA) sont *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus spp.* Etant donné le poids économique de ces espèces, et leur potentiel en tant qu'agent biothérapeutique, les facteurs qui affectent la croissance de ces bactéries sont suivis avec attention. Les premiers bactériophages infectant les BL ont été décrits dans les années 1930. On estime aujourd'hui qu'entre 0,1 et 10 % des fermentations lactiques sont concernés par les problèmes liés aux phages (Grath & Sinderen, 2007). Malgré les dispositions prises au sein des usines (nettoyage, maîtrise de la contamination aéroportée...), les attaques virales sont récurrentes, notamment en production laitière. Les phages sont problématiques dans les fermentations modernes, où une seule culture est utilisée en rotation, de façon répétée. Les phages sont mis en cause dans les problèmes d'acidification, et le phénomène touche également certaines flores d'aromatisation comme le genre *Leuconostoc* (Kleppen *et al.*, 2012; Pujato *et al.*, 2014).

Les phages associés aux fermentations de produits végétaux sont moins bien décrits. Des phages infectant *Leuconostoc mesenteroides/paramesenteroides* isolés de choux et de Kimchi ont été rapportés (Lu *et al.*, 2010). Ils sont phylogénétiquement éloignés des phages infectant les *Leuconostocs* laitiers. Deux autres phages infectant des *Lactobacilles* (*Lb. sanfranciscensis* et *Lb. plantarum*) ont été isolés de sourdough (Foschino *et al.*, 1995, 2005).

Beaucoup de connaissances ont été acquises, et pendant les trente dernières années, toutes les technologies « omiques » ont été appliquées à l'étude des phages de BL. Plusieurs génomes complets de phages sont disponibles (**Tab. III**). Les études se focalisent sur les interactions avec l'hôte et une meilleure compréhension des interactions phage-récepteur. La structure de plaque basale a été obtenue pour des phages de Lactocoques (pour revue Mahony *et al.*, 2014). L'autre priorité reste la compréhension des mécanismes naturels de résistance, exploitables dans l'industrie. L'association de souches ayant des profils différents de sensibilité aux phages sont utilisées en rotation (Castro-Nallar *et al.*, 2012).



**Figure 13.** Première observation des oenophages en microscopie électronique (Sozzi *et al.*, 1976).

## 1.2. Les oenophages

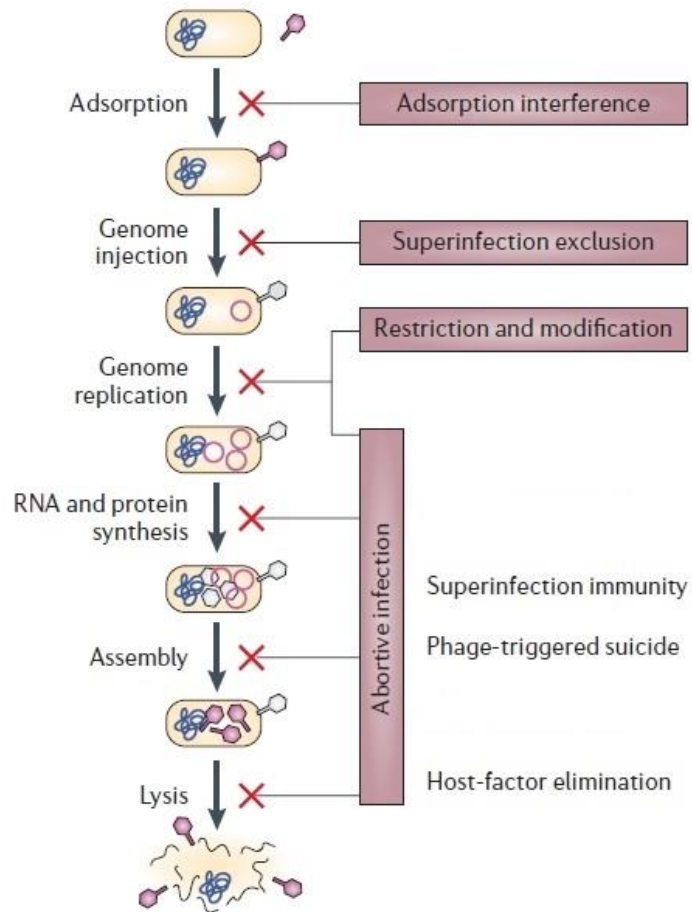
En comparaison avec les bactériophages des autres BL d'intérêt technologique (*Lactococcus*, *Streptococcus*,...), les connaissances sur les oenophages sont très limitées. Ils présentent la morphologie majoritairement trouvée chez les phages de BL et appartiennent à la famille des *Siphoviridae* (**Fig. 13**). La taille du génome peut varier de 25 à 40 kb et présente des extrémités cohésives. L'établissement de groupes après réalisation de profils de restriction de l'ADN, ou analyse des protéines structurales a été proposé, sans réel succès. Les oenophages sont classifiés en deux, quatre et cinq groupes selon les origines géographiques des échantillons (Arendt & Hammes, 1992; Boizet *et al.*, 1992; Nel *et al.*, 1987). Une équipe portugaise s'est basée sur les mêmes critères et a classé les oenophages en six groupes (Santos *et al.*, 1996). Cependant cette dernière étude a porté sur des souches lysogènes provenant de différentes régions. Elle a montré que les différents phages isolés présentent une homologie assez forte (de 60 à 100 %) par hybridation ADN/ADN.

Les spectres d'hôtes peuvent être relativement larges, quatre oenophages isolés du vin, ainsi qu'un phage ( $\phi$ 1002) induit d'une souche sont actifs respectivement contre 40 % et 46,6 % des souches testées (sur un total de 101 et 105 souches respectivement) (Davis *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1996).

Les séquences disponibles dans les bases de données sont essentiellement limitées aux modules d'intégrations et de lyse (*attP*, *int*, *lys*, *hol*). L'organisation du module de recombinaison site-spécifique est très similaire à celle des autres phages de BL.

Zé-Zé *et al.* (2008) a montré que la plupart des polymorphismes observés dans chaque génome peut être corrélée à la présence d'éléments mobiles (séquences d'insertion ou prophages). A partir de 2006, une approche d'hybridation soustractive entre plusieurs souches présentant des propriétés œnologiques différentes a été menée au sein de notre laboratoire. Cette comparaison a révélé que 26 % des séquences variables sont d'origines virales (Bon *et al.*, 2009). Une autre équipe a estimé la valeur à 36 % (Borneman *et al.*, 2010). Des pourcentages élevés de lysogénie (45 % à 66 %) avaient été mis en évidence chez l'espèce après induction des souches à la MC (Arendt *et al.*, 1991; Poblet-Icart *et al.*, 1998; Tenreiro *et al.*, 1993).





**Figure 14. Les mécanismes de résistance aux bactériophages.** Chaque étape du cycle de multiplication du bactériophage, de l'adsorption à la lyse bactérienne peut être inhibée par un mécanisme de défense particulier de la bactérie (adaptée de Sturino & Klaenhammer, 2006).

## 2. Les mécanismes de résistance aux phages chez les BL

Les bactéries et les bactériophages cohabitent dans un équilibre en constant réajustement, dans lequel on assiste à l'apparition de bactéries résistantes aux phages, et de nouveaux phages actifs sur ces bactéries (Stern & Sorek, 2011). C'est la théorie de la course à l'armement continue ou "continuous arm race" (Samson & Moineau, 2013).

Les bactéries ont développé bon nombre de stratégies pour se protéger des attaques virales permanentes. Ces mécanismes naturels de résistance sont susceptibles de bloquer le phage à toutes les étapes de son cycle infectieux (Fig. 14).

### 2.1. Inhibition de l'adsorption

La première étape de l'infection d'une bactérie par un phage est l'adsorption à un récepteur spécifique présent à la surface de la paroi bactérienne. Empêcher l'accès du phage à ses récepteurs représente donc la première ligne de défense de la bactérie. Une modification ou une perte de ces récepteurs par la bactérie peut lui assurer une résistance.

Chez *Lactococcus lactis*, la production d'exopolysaccharides (Eps) protège la souche des bactériophages et rend la souche plus résistante à l'action du lysozyme (Looijesteijn *et al.*, 2001). Cependant ce rôle protecteur des Eps n'est pas applicable pour toutes les BL, car ils peuvent aussi contenir des récepteurs phagiques (Dupont *et al.*, 2004; Ainsworth *et al.*, 2014). Chez *Lc. lactis* MG1363, le polysaccharide entourant la souche est proposé comme contenant le récepteur du phage sk1 qui présente un défaut d'adsorption sur la souche mutée pour ce polysaccharide (Chapot-Chartier *et al.*, 2010).

La modification des récepteurs s'opère en présence d'une forte pression en phages, et conduit à l'isolement de bactéries devenues résistantes à un/plusieurs phage(s) (BIM, Bacteriophage Insensitive Mutant). Ces souches sont obtenues après exposition répétée de la souche sensible à un ou plusieurs phages ( $MOI \geq 1$ ). Très souvent les BIMs possèdent le même profil génétique que la souche sensible utilisée au départ. Cependant un cas de délétion d'un fragment de 200 kpb a été notée dans le chromosome de BIMs générés à partir de souches sensibles de *S. thermophilus* (Mills *et al.*, 2007).



## 2.2. Inhibition de l'injection de l'ADN

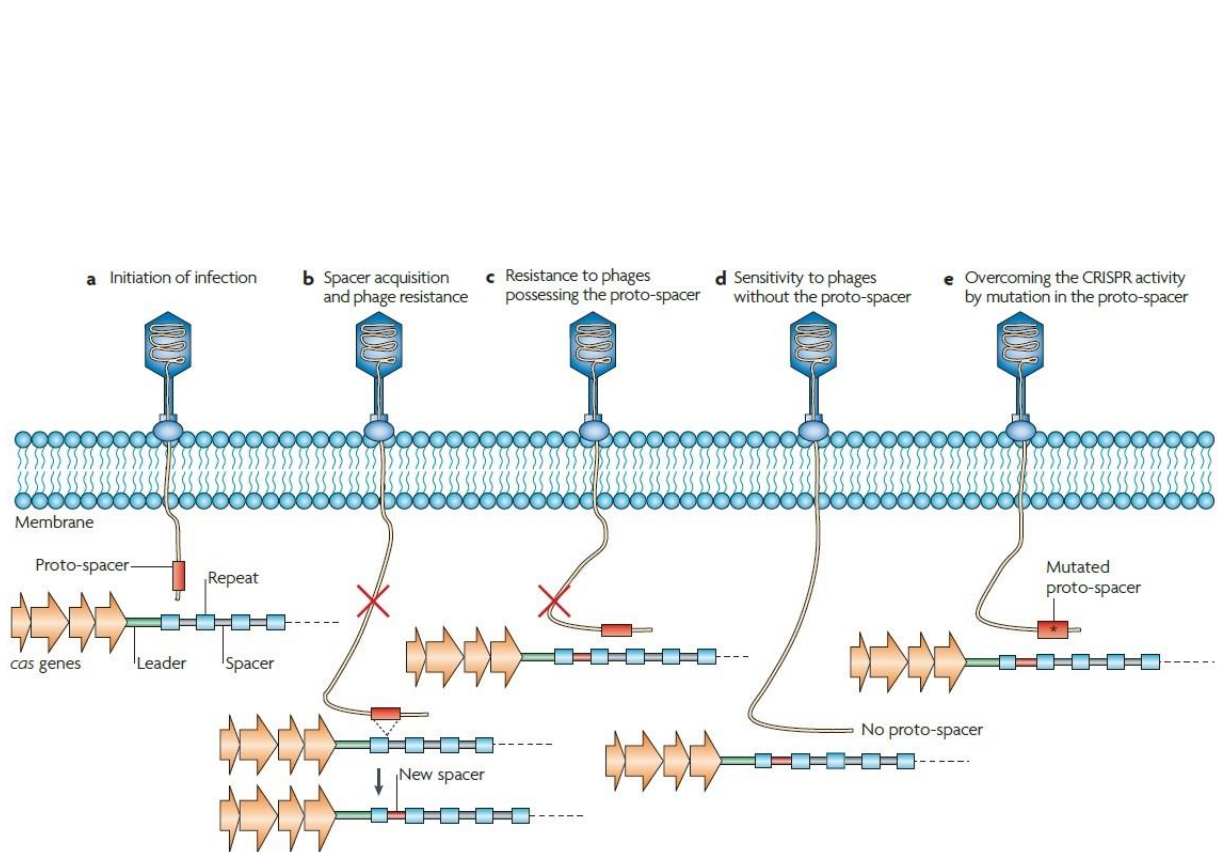
Le phage après adsorption injecte son matériel nucléaire dans le cytoplasme. Cependant la pénétration de l'ADN viral peut être bloquée par un mécanisme appelé "superinfection exclusion" (*Sie*). Le système *Sie* le mieux décrit est celui du phage tempéré Tuc2009 infectant *Lactococcus lactis* (McGrath *et al.*, 2002). Des systèmes *Sie* différents de *sie<sub>2009</sub>* ont par la suite été identifiés chez d'autres souches de *Lactococcus lactis*. Les protéines sont localisées au niveau de la membrane, et protègent la souche contre un groupe génétique distinct de phages de Lactocoques (groupe 936) par inhibition de l'injection de l'ADN phagique dans la cellule (Mahony *et al.*, 2008).

Des gènes *Sie* ont également été identifiés chez *Streptococcus thermophilus*, où ils sont souvent localisés au niveau du module de lysogénie du prophage (Bruttin *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2006). Chez le phage tempéré de *S. thermophilus* TP-J34, le gène code une lipoprotéine Ltp qui inhibe l'injection de l'ADN phagique, aussi bien chez *S. thermophilus* que chez *L. lactis*, où son expression confère une résistance accrue au phage P008 (EOP < 10<sup>-9</sup>) (Sun *et al.*, 2006).

Le gène *Sie* est fréquemment localisé à proximité du gène de répresseur ("CI-like protein"). En effet ces gènes font partie des gènes prophagiques dont la transcription est hautement active pendant la lysogénie. L'immunité à la surinfection protège la bactérie contre les phages homologues, alors que *Sie* peut protéger des phages hétérologues. Ainsi, deux cadres ouverts de lectures, *orf203* et *orf127* présents sur le phage tempéré Sfi21, codent respectivement un répresseur et une protéine *Sie* (Bruttin *et al.*, 1997, 2002). Le premier protège uniquement des phages homologues alors que le second confère une résistance à des phages hétérologues, et ne protège pas vis-à-vis du phage Sfi21 lui-même.

## 2.3. Clivage des acides nucléiques

L'ADN viral après injection peut être dégradé par une enzyme de restriction. L'endonucléase est associée à une activité méthylase protégeant l'ADN bactérien. Le couple forme un système R/M dont le rôle est de limiter l'entrée d'ADN "non soi" dans la cellule (Tock & Dryden, 2005). L'ADN phagique non-modifié entré dans la cellule est coupé par



**Figure 15. Mécanisme du système CRISPR.** a) L'ADN phagique pénètre dans la cellule et le cycle lytique est initié. b) Une petite portion des cellules infectées survivra (environ  $1 \times 10^{-6}$ ) et ces clones hériteront au niveau du locus du CRISPR d'une répétition supplémentaire accompagnée d'un nouveau "spacer" acquis du génome phagique infectant. c) L'acquisition de la nouvelle répétition contenant la séquence phagique confère une résistance à la bactérie hôte. Tout phage infectant contenant 100 % de cette petite séquence sera immédiatement inactivé. d) La souche reste toujours sensible à un phage ne possédant pas cette séquence nouvellement acquise. e) Les phages ayant une mutation ponctuelle ou une délétion au niveau de leur "proto-spacer" peuvent passer outre la défense du CRISPR et initier leur cycle lytique (Labrie *et al.*, 2010).

l'enzyme de restriction bien avant que la méthylase bactérienne puisse modifier le site. Les systèmes R/M sont très répandus chez les BL, où ils peuvent être codés soit sur un plasmide (Forde *et al.*, 1999; Kong & Josephsen, 2002), soit plus souvent sur le chromosome bactérien comme le cas chez *Streptococcus thermophilus* (Sturino & Klaenhammer, 2004).

Le locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) et les gènes *Cas* (CRISPR Associated proteins) constituent le système d'immunité adaptative CRISPR (**Fig. 15**). Chez *S. thermophilus*, quatre systèmes CRISPR-*Cas* ont été identifiés mais seuls deux sont actifs (Barrangou *et al.*, 2007). Les loci CRISPR sont généralement à localisation chromosomique. Néanmoins, leur présence a été associée récemment à des plasmides chez *Lc. lactis* (Millen *et al.*, 2012).

Chaque région CRISPR est composée d'une région promotrice suivie par un enchaînement de séquences répétées (23 à 47 pb) séparées par des séquences variables nommées spacers (21 à 72 pb). Le nombre d'unités repeat-spacer est en général inférieur à 50 (Horvath *et al.*, 2009). Ces séquences variables dérivent d'ADN étrangers provenant de bactériophages ou plasmides (Mojica *et al.*, 2005; Barrangou *et al.*, 2007). Lorsqu'il s'agit de séquences virales, ces dernières peuvent correspondre à n'importe quelle séquence du génome du virus, codante ou non. Lorsqu'il s'agit de séquences codantes, elles correspondent généralement à des gènes exprimés précocement au cours du cycle lytique (Deveau *et al.*, 2008).

La résistance est basée sur le fait que la bactérie survivant à une première rencontre avec un phage acquiert une séquence de l'ADN de l'agresseur. Cette séquence va être ajoutée sous forme d'une nouvelle unité repeat-spacer à l'extrémité 5' du locus CRISPR de la bactérie. Cette nouvelle acquisition va rendre la bactérie résistante à toute infection ultérieure par ce phage. Ce phénomène peut être itératif : une même bactérie peut acquérir des spacers de différents phages lors d'infections successives et ainsi devenir multi-résistante (**Fig. 15**).

Lorsque la bactérie est infectée, le gène CRISPR est transcrit en un long ARNcr non mature contenant la totalité des unités repeat-spacer. Ce pré-ARN est maturé en plusieurs ARNcr contenant un spacer et des parties de répétitions adjacentes. Cet ARNcr va ensuite s'associer avec des protéines *Cas* pour former un complexe capable de cliver de manière



séquence spécifique un ADN étranger, dans notre cas l'ADN viral. Les gènes *Cas* codent des protéines telles que des nucléases, hélicases, polymérase et protéines de liaison de polynucléotides (Haft *et al.*, 2005).

Le système CRISPR est fonctionnel chez de nombreux genres de bactéries lactiques d'intérêt industriel comme *Lactobacillus* (*acidophilus*, *brevis*, *casei*, *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *fermentum*, *helveticus*, *ramnosus*, *salivarius*), *Streptococcus thermophilus* ou encore le genre apparenté *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *catenulatum*, *dentium*, *longum*). L'intérêt évident du système est qu'il est naturel, efficace et adaptatif. En conséquence, ceci a mené au développement de nombreux projets de recherche sur le sujet, dont certains ont débouché sur la publication de brevets.

## 2.4. Avortement de l'infection

Ces mécanismes constituent la dernière ligne de défense naturelle d'une bactérie face à une infection phagique. Dans tous les cas, l'adsorption et l'injection se font normalement dans une souche *Abi*<sup>+</sup>, puis la cellule infectée meurt en produisant peu ou pas de phages. Les systèmes *Abi* agissent à diverses étapes précises du cycle lytique : de la réplication/transcription de l'ADN, à la synthèse des protéines, jusqu'à l'assemblage des particules ou agissent sur le temps de lyse. La plupart des systèmes *Abi* connus ont été découverts chez *Lc. lactis*. A l'heure actuelle, 23 systèmes *Abi* ont été identifiés chez cette espèce (Chopin *et al.*, 2005; Durmaz & Klaenhammer, 2007; Haaber *et al.*, 2008). La grande majorité est présente sur un plasmide. L'organisation est simple, et le phénotype est codé par un seul gène, à l'exception de six systèmes plus complexes (formés de deux ou trois gènes) (Szczebankowska *et al.*, 2013). Certains mécanismes d'action sont mieux documentés. Par exemple, le système *AbiZ* induit une lyse prématurée des cellules infectées, ce qui entraîne une réduction de la "burst size" (Durmaz & Klaenhammer, 2007). Selon les auteurs, le temps de lyse étant contrôlé par la holine, *AbiZ* interagirait alors avec cette dernière, ou son inhibiteur, pour que l'activation ait lieu prématurément.





### 3. Mécanisme de "Phage escape"

Face aux différents systèmes de résistance développés par la bactérie, les bactériophages se sont dotés de différentes stratégies afin d'outre-passer ces barrières. Il peut s'agir d'optimiser l'accès aux récepteurs de l'hôte ou de protéger l'acide nucléique contre d'éventuels systèmes R/M.

- Pour accéder de nouveau aux récepteurs de l'hôte, les bactériophages peuvent s'adapter à un nouveau récepteur, ou encore optimiser l'accès à un récepteur qui est masqué. A titre d'exemple, le phage LLH de *Lb. delbrueckii* via une mutation dans le gène codant le RBP (Receptor Binding Protein) s'adsorbe de nouveaux sur des mutants d'adsorptions de la souche (Ravin *et al.*, 2002). Les phages Tuc2009 et TP901-1 de *Lc. lactis* possèdent une activité endopeptidase au bout de la partie caudale du phage qui leur permet d'hydrolyser la paroi bactérienne (Stockdale *et al.*, 2013).
- L'efficacité d'un système R/M vis-à-vis d'un phage est fonction du nombre de sites de coupure présents sur le génome phagique. Des mutations ponctuelles au niveau de ces sites entraînent irrémédiablement l'apparition de phages moins sensibles à ce système. Les phages peuvent aussi acquérir des gènes de méthyltransférases ou encore de glycosyltransférases pour modifier leur acide nucléique et éviter le clivage (Markine-Goriaynoff, 2004; Murphy *et al.*, 2013). Par exemple, le phage  $\phi 50$  de *Lc. lactis* a acquis une méthyltransférase par recombinaison avec un plasmide de son hôte (Hill *et al.*, 1991). Disposer d'un tel gène confère une protection du génome phagique contre le système R/M de son hôte et d'autres systèmes R/M ayant les mêmes sites de coupures.
- Des phages capables d'éviter un système CRISPR (CRISPR Escape Mutant) ont d'ores et déjà été isolés (Deveau *et al.*, 2008 ; Villion & Moineau, 2013). Même si le mécanisme CRISPR semble performant, de nombreux experts mettent donc en garde les sociétés basant leur stratégie de sélection de levains sur ce seul mécanisme, et préconisent d'associer des mécanismes CRISPR et RM par exemple.



## **MATERIELS ET METHODES**

**Tableau IV. Liste des souches de *O. oeni* utilisées lors de cette étude.**

Nom	Désignation	Origine /Nom commercial	Numéro d'accèsion (Genbank)	MLST
IOEB 0502	0502	France	AZKL00000000	B
ATCC BAA-1163	ATCC BAA-1163	Vin rouge, France	AAUV00000000	B
Sarco 12	S12	Vin blanc, France	AZLH00000000	B
Sarco 13	S13	Vin rouge, France	AZKB00000000	B
IOEB C23	C 23	Cidre, Normandie France	AZJU00000000	B
IOEB 0501	0501	Vin rouge, France	AZIP00000000	B
IOEB 9304	9304	Cidre, France	AZKI00000000	B
IOEB C28	C28	Cidre, Bretagne France	AZLE00000000	B
<b>AWRI B418<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B418</b>	<b>MCW Lallemand</b>	<b>ALAE00000000</b>	<b>B</b>
IOEB 9803	9803	Vin rouge, France	AZKF00000000	B
IOEB 9805	9805	Vin rouge, France	AZKE00000000	B
IOEB 8417	8417	Vin rouge filant, France	AZKH00000000	B
<b>L181<sup>a</sup></b>	<b>L181</b>	<b>Vin, Australie</b>	<b>ND</b>	<b>B</b>
<b>Expertise C<sup>a</sup></b>	<b>ExpC</b>	<b>Expertise C, Oenofrance</b>	<b>ND</b>	<b>B</b>
<b>AWRI B429<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B429</b>	<b>Lalvin VP41 Lallemand</b>	<b>ACSE00000000</b>	<b>A</b>
AWRI B568	AWRI B568	Australie	<b>ALAJ00000000</b>	A
AWRI B576	AWRI B576	Australie	<b>ALAK00000000</b>	A
Sarco 23	S23	Vin blanc, Angleterre	AZLL00000000	A
IOEB 0608	0608	France	AZKJ00000000	A
Sarco 11	S11	Vin blanc effervescent, France	AZJX00000000	A
AWRI B202	AWRI B202	Australie	<b>AJTO00000000</b>	A
<b>IOEB CiNe<sup>a</sup></b>	<b>CiNe</b>	<b>Starter CHR Hansen</b>	<b>AZJV00000000</b>	<b>A</b>
AWRI B304	AWRI B304	Australie	<b>AJIJ00000000</b>	A
<b>Sarco 28<sup>a</sup></b>	<b>S28</b>	<b>B28 PreAc, Laffort, France</b>	<b>AZJY00000000</b>	<b>A</b>
AWRI B318	AWRI B318	Australie	<b>ALAD00000000</b>	A
IOEB 9517	9517	Floc de Gascogne, France	AZKG00000000	A
IOEB L65_2	L65_2	Vin rouge, Liban	AZLR00000000	A
<b>IOEB Sarco 450<sup>a</sup></b>	<b>450</b>	<b>450 PreAc Laffort, France</b>	<b>AZLT00000000</b>	<b>A</b>
IOEB L40_4	L40_4	Vin rouge, Liban	AZLQ00000000	A
IOEB 1491	1491	Vin rouge, France	AZLG00000000	A
Sarco 19	S19	Vin rouge, France	AZLK00000000	A
<b>AWRI B553<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B553</b>	<b>Elios-1 Lallemand</b>	<b>ALAI00000000</b>	<b>A</b>
IOEB L18_3	L18_3	Vin rouge, Liban	AZLO00000000	A
IOEB B10	B10	France	AZIW00000000	A
<b>IOEB Sarco 277<sup>a</sup></b>	<b>277</b>	<b>SB3 Laffort, France</b>	<b>AZKD00000000</b>	<b>A</b>
Sarco 15	S15	Vin rouge, France	AZLJ00000000	A
<b>Sarco 161<sup>a</sup></b>	<b>S161</b>	<b>350 PreAc Laffort, France</b>	<b>AZLN00000000</b>	<b>A</b>
AWRI B129	AWRI B129	Vin rouge, France	<b>AJPT00000000</b>	A
IOEB Sarco 436a	436a	Vin rouge de Bordeaux, France	AZLS00000000	A
<b>Vitilactic F<sup>a</sup></b>	<b>VF</b>	<b>Starter VF, Martin Vialatte</b>	<b>AZLM00000000</b>	<b>A</b>
<b>AWRI B419<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B419</b>	<b>Lalvin EQ54 Lallemand</b>	<b>ALAF00000000</b>	<b>A</b>
PSU-1	PSU-1	Vin rouge, USA	NC_008528	A
Sarco 14	S14	Vin rouge, France	AZLI00000000	A
<b>AWRI B422<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B422</b>	<b>Viniflora CHR35, Chr.Hansen</b>	<b>ALAG00000000</b>	<b>A</b>
<b>IOEB B16<sup>a</sup></b>	<b>B16</b>	<b>Lactoenos B16 Laffort, France</b>	<b>AZKC00000000</b>	<b>A</b>
IOEB 0205	0205	France	AZHH00000000	A
<b>AWRI B548<sup>a</sup></b>	<b>AWRI B548</b>	<b>Vitilactic BL01 Lallemand</b>	<b>ALAH00000000</b>	<b>A</b>
Sarco 25	S25	Vin rouge, France	AZJZ00000000	A
Sarco 22	S22	Vin blanc, France	AZKA00000000	A

<sup>a</sup> Souche commerciale, \**O. kitaharae*

Souche utilisée pour les analyses *in silico* uniquement

# 1. Physiologie bactérienne : matériel biologique et conditions de propagation

## 1.1. Hôtes bactériens, conditions de culture et numération

### 1.1.1. Souches hôtes

Un ensemble de 56 souches de *O. oeni* et trois souches d'*O. kitaharae* ont été utilisées lors de cette étude. Elles ont fait l'objet de caractérisations phénotypiques et génétiques et ces éléments sont présentés dans le **tableau IV**. Le panel inclut des souches isolées à partir de vins (rouges, blancs, champagne), et d'autres boissons fermentées comme le cidre, ou le Floc de Gascogne. Les isollements ont été réalisés à différents stades de fermentation (baies, pendant la FA, pendant la FML). Les échantillons collectés en France proviennent majoritairement de la région Aquitaine, et de Gironde plus particulièrement. D'autres origines géographiques sont également représentées dans le panel (Australie, Angleterre, Liban, USA).

La plupart des souches ont été isolées par l'EA Oenologie lors de programmes de recherche antérieurs visant à étudier la diversité intra-spécifique chez *O. oeni* (ANR BIODIV-07-BDIV- et ANR OENOPOLYS -09-ALIA, principalement). Elles ont été regroupées et conservées au sein de la collection interne du laboratoire, et bénéficient de l'appellation IOEB. D'autres souches ont été isolées par la société Sarco (Sarco), ou lors de projets de recherche joints entre l'EA Oenologie et Sarco (IOEB-Sarco). Quatre souches ont été obtenues auprès de collections (ATCC, American Type Culture Collection et DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Enfin, des souches exploitées commercialement comme levains de fermentation malolactique complètent le panel et ont été obtenues auprès de groupes industriels (Laffort, Lallemand, CHR Hansen notamment).

### 1.1.2. Conditions de culture et de conservation des souches de *O. oeni*

Les souches sont cultivées en milieu MRS (De MAN *et al.*, 1960) ou bien en milieu « jus de raisin », qui a été mis au point dans notre laboratoire.

**Tableau IV (suite). Liste des souches de *O. oeni* utilisées lors de cette étude.**

Nom	Désignation	Origine /Nom commercial	Numéro d'accèsion (Genbank)	MLST
Sarco 22	S22	Vin blanc, France	AZKA00000000	A
IOEB 0607	0607	France	AZKK00000000	A
IOEB L26_1	L26_1	Liban	AZLP00000000	A
IOEB C52	C52	Cidre, Normandie France	AZLF00000000	C
MC1	MC1	Champagne, France	ND	A
<b>Viniflora Oenos<sup>a</sup></b>	<b>VO</b>	<b>Viniflora Oenos, CHR Hansen</b>	<b>ND</b>	<b>A</b>
Sarco S51	S51		ND	ND
<b>Microenos B1<sup>a</sup></b>	<b>B1</b>	<b>Microenos B1, Laffort France</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
NRIC_0647*	O.kit47	Résidu de shochu, Japon		
NRIC_0649*	O.kit49	Résidu de shochu, Japon		
NRIC_0650*	O.kit50	Résidu de shochu, Japon		

<sup>a</sup> **Souche commerciale, \**O. kitaharae***

Souche utilisée pour les analyses *in silico* uniquement

Le milieu MRS utilisé est commercialisé par la société Difco et sa composition est la suivante : bactopeptone (10 g/l), extrait de bœuf (8 g/l), extrait de levures (4 g/l), glucose (20 g/l), trisodium citrate (2 g/l), sodium acétate (5 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (0,2 g/l),  $\text{MnSO}_4$  (0,1 g/l), Tween 80® (1 ml/l). Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée d'HCl. Le milieu « jus de raisin » est composé de 250 ml/l de jus de raisin rouge commercial, de 5 g/l d'extrait de levures et de 1 ml/l de Tween 80. Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée de NaOH.

Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d'agar (20 g/l). Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes.

Les cultures de *O. oeni* sont incubées à 25 °C dans des tubes de 10 ml.

Pour la conservation des souches, la culture en phase exponentielle est ajoutée de 30 % de glycérol (volume/volume : v/v), homogénéisée et placée à -20 °C ou -80 °C.

### 1.1.3. Mesure de la croissance et numération bactérienne

La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 600nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon 932, Beckman). Pour l'espèce *O. oeni*, une unité de DO représente une concentration de  $2 \times 10^9$  UFC/ml (unité formant colonie par millilitre) en milieu MRS.

Le dénombrement des cultures est réalisé sur le milieu « jus de raisin » ou sur milieu MRS. La culture est diluée dans de l'eau physiologique (9 g/l de NaCl), puis un volume de chaque dilution décimale (100µl) est étalé sur une boîte de Petri à l'aide de billes stériles. Après une incubation de 7 à 10 jours, les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 sont utilisées pour le calcul de la concentration bactérienne, qui est exprimée en UFC/ml, selon la formule  $N = (n \times 10) \times 1/c$  ; où **n** est le nombre de colonies et **c** le coefficient de dilution.





#### **1.1.4. Microvinifications dans un vin ayant réalisé sa fermentation alcoolique**

Les souches sont cultivées en MRS et sont inoculées directement dans le vin sans acclimatation préalable à raison de  $10^7$  UFC/ml. Pour réduire au maximum l'apport de MRS dans le vin inoculé, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans un volume équivalent de vin et serviront ainsi d'inoculum à la FML. Des numérations bactériennes sont réalisées après 24h d'inoculation afin d'observer le taux de survie des souches inoculées. La cinétique de dégradation de l'acide L-malique est suivie par dosage enzymatique grâce au kit Roche Boehringer (R-biopharm). La durée de la FML correspond au temps nécessaire pour atteindre 0,2 g/l d'acide L-malique dans le milieu.

### **1.2. Isolement de bactériophages infectant *O. oeni***

#### **1.2.1. Mise en évidence/dénombrement des particules virales**

La titration des suspensions virales est déterminée par la technique de la double-couche (Adams & Anderson, 1960). Les milieux utilisés correspondent à une base MRS additionnée de  $\text{CaCl}_2$  et de  $\text{MgSO}_4$  (16 mM et 15 mM respectivement) dans le but de favoriser la première étape du cycle infectieux des virus qui est l'adsorption sur la bactérie hôte. Le milieu obtenu prend le suffixe «  $\phi$  » pour le différencier du milieu sans cations.

Le lysat à titrer est filtré sur membrane 0.22  $\mu\text{m}$ . Des filtres en PES (polyethersulfone) ont été choisis. En accord avec les travaux de (Mocé-Llivina *et al.*, 2003), aucune adsorption des oenophages sur la membrane n'a été observée. Une gamme de dilutions décimales du lysat filtré est réalisée en bouillon MRS $\phi$ . Une aliquote de chaque dilution (100  $\mu\text{l}$ ) est mise en contact avec une souche bactérienne sensible (200  $\mu\text{l}$  à  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2 - 0,3$ ) dans un tube contenant une gélose MRS $\phi$  semi-solide (5 ml ; 0,6 % p/v en agar) maintenue en surfusion à 55 °C. Le mélange est immédiatement coulé à la surface d'une gélose MRS $\phi$  (2 % d'agar) préalablement solidifiée dans une boîte de Petri. Les plages de lyse sont observables après incubation des boîtes à 25 °C pendant 4 à 7 jours. Pour certains phages tempérés, les plages



ont été observées plus précocement (à partir de 48 h), car leur contour était plus difficilement détectable après des incubations prolongées.

La dilution contenant entre 30 et 300 plages de lyse est retenue pour déterminer la concentration exacte de la suspension virale en utilisant la formule :  $N = (n \times 10) \times 1/c$  ; où  $n$  est le nombre de plages de lyse et  $c$  le coefficient de dilution. La concentration est exprimée en unité formant plaque par millilitre (UFP/ml). Le seuil de quantification correspond à la concentration de 10 UFP/ml.

Une alternative moins onéreuse en milieu de culture a été parfois utilisée. Seule la souche sensible est ajoutée dans la gélose molle (MRS $\phi$ ) qui est coulée sur la gélose dure. Après solidification, les différentes dilutions de lysat phagique sont déposées à la surface de la gélose sous la forme de gouttes de 10  $\mu$ l. La dilution présentant un nombre de plages compris entre 5 et 25 est retenue. La concentration en phages est déterminée après comptage des plages de lyse obtenues en utilisant la formule:  $N = (n \times 100) \times 1/c$  ; où  $n$  est le nombre de plages de lyse et  $c$  le coefficient de dilution. La technique a pour avantage d'être plus économe en milieu, car elle permet de tester la totalité de la gamme de dilutions d'un échantillon ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) sur une seule boîte. Son inconvénient est de présenter un seuil de quantification réduit à 100 UFP/mL.

### 1.2.2. Recherche d'oenophages

- *Protocoles de recherche à partir de l'environnement œnologique*

Les phages ont été recherchés dans différents échantillons de boissons fermentées (vins rouges et blancs). Ces échantillons ont été collectés à différents stades des procédés de vinification (moûts, FA, FML) dans des châteaux de la Gironde.

Pour chaque échantillon deux stratégies ont été adoptées et correspondent à:

- une recherche directe de particules actives, après filtration de l'échantillon sur une membrane PES de 0,45  $\mu$ m;



- une amplification préalable des particules actives impliquant la dilution de l'échantillon en bouillon MRS $\phi$  (1/10) suivie d'une incubation de l'échantillon (5 jours à 25 °C). L'échantillon est ensuite centrifugé (5000 g, 10 min) puis filtré.

Chaque échantillon est ensuite testé par la technique de la double-couche sur sept souches de *O.oeni* indicatrices différentes.

- *Isolement de phages après induction de souches lysogènes*

L'induction peut être spontanée ou elle peut être provoquée par des agents mutagènes. L'agent inducteur utilisé est la mitomycine C (MC), issue de la bactérie *Streptomyces caespitosus*. La MC induit des dommages à l'ADN bactérien (Shiba *et al.*, 1959). Dans ces conditions, le système de réparation SOS de l'ADN est induit et active la protéine RecA, qui provoque le clivage du répresseur prophagique et donc l'initiation du cycle lytique (Hendrix, 1983). Le protocole suivi a été optimisé sur la souche B10 lysogène pour le phage  $\phi$ 10MC isolé précédemment et conservé au laboratoire (Gindreau *et al.*, 1997). La MC a été ajoutée aux cultures bactériennes de *O. oeni* en tout début de phase exponentielle ( $DO_{600nm} = 0,1$ ), à une concentration finale de 1  $\mu$ g/ml. Un témoin sans MC est réalisé en parallèle. Les deux cultures sont ensuite incubées à l'obscurité à 25 °C. La DO est suivie pendant environ 48 heures de culture. Dès que la lyse est détectée dans l'essai, des échantillons de culture sont collectés et centrifugés. La concentration en phages est établie par la technique de la double-couche. Elle est comparée à la valeur obtenue pour la culture non induite. En l'absence de lyse dans l'échantillon, une recherche de phages est réalisée systématiquement en fin d'expérience.

### **1.2.3. Purification des phages à partir des plages de lyse**

Les différentes plages de lyse obtenues sont comparées visuellement selon l'hôte, la taille (petite  $\Phi \leq 1$  mm, moyenne  $1 \text{ mm} < \Phi \leq 3$  mm, grande  $\Phi > 3$  mm) et l'aspect (clair ou trouble). Chaque type de plage est excisé délicatement à l'aide d'un cône stérile et transféré dans 500  $\mu$ l de MRS $\phi$  stérile. L'échantillon est laissé à température ambiante pendant 30 min afin de faciliter la diffusion des phages du cylindre d'agar vers le milieu. Une gamme de



dilutions de cet échantillon est ensuite réalisée et analysée par la technique de la double-couche avec la même souche de propagation: le but est d'obtenir des plages de lyse bien distinctes. La procédure de purification des plages de lyse est ainsi répétée trois fois.

#### 1.2.4. Production de lysats concentrés

- *En milieu solide*

A l'issue du protocole de purification des phages à partir des plages de lyse, le volume de lysat pur obtenu est de 500  $\mu$ L. Cette suspension est diluée de façon décimale et un volume de 100  $\mu$ l de chaque dilution est testé en double-couche (la souche ayant permis la détection est conservée). La concentration de suspension virale donnant une lyse dite confluyente est repérée et un ensemble de dix boîtes sont préparées dans les mêmes conditions. Après incubation (4-7 jours), les dix géloses molles sont récupérées à l'aide d'une spatule stérile, réunies et centrifugées à 5000  $g$  pendant 10 min. Le surnageant est filtré sur filtre 0,22  $\mu$ m.

Cette technique a été appliquée aux phages nouvellement isolés permettant ainsi d'obtenir un premier stock dont les concentrations varient entre  $10^7$  UFP/ml et  $10^{10}$  UFP/ml selon les phages.

- *En milieu liquide*

Cette seconde technique est plus rapide. Elle a été appliquée lorsque le volume de stock était devenu insuffisant, ou que sa concentration avait chuté au cours du stockage.

La souche propagatrice (400  $\mu$ l à  $DO_{600nm} = 0,1$ ) est inoculée dans 10 ml de bouillon MRS $\phi$ . Un petit volume de suspension virale (5 – 50  $\mu$ l), diluée ou non, est ajouté. Un témoin sans phage est réalisé dans les mêmes conditions. Les échantillons sont incubés à 25 °C pendant 72 h à 96 h et la croissance est suivie par inspection visuelle. Le tube présentant la lyse la plus importante en présence de la plus faible quantité de phages est retenu. La culture est débarrassée des cellules bactériennes par centrifugation (10000  $g$ , 5 min) et filtrée (0,22  $\mu$ m).



**Tableau V. Abréviation attribuée aux différents cépages de vin utilisés pour isoler les phages.**

<b><i>Cépage</i></b>	<b><i>Type de vinification</i></b>	<b><i>Abréviation</i></b>
<b>Cabernet Sauvignon</b>	Rouge	CS
<b>Cabernet Franc</b>	Rouge	CF
<b>Merlot</b>	Rouge	M
<b>Sauvignon</b>	Liquoreux	Sv
<b>Sémillon</b>	Liquoreux	Sm
<b>Muscatelle</b>	Liquoreux	Mu
<b>Carménère</b>	Rouge	C
<b>Pauillac</b>	Rouge	P

### 1.2.5. Nomenclature des bactériophages

A l'heure actuelle, il n'existe pas de règles universelles pour la nomenclature des bactériophages au sein des laboratoires ou dans la littérature. Les noms attribués aux phages isolés lors de cette étude ont été faits pour faciliter leur utilisation et leur identification au sein du laboratoire. Pour les phages isolés de la campagne 2011, un phage donné aura comme initiale la lettre  $\phi$  pour désigner sa nature, suivi d'un chiffre (19 à 39) pour désigner l'échantillon dans lequel il a été isolé et enfin le nom de la souche de propagation. Dans le cas où la propagation a été refaite sur une autre souche, le nom de cette dernière est rajouté. Ainsi le phage  $\phi$ 34-S161/277 est le phage isolé de l'échantillon 34 sur la souche S161, et repropagé sur la souche IOEB S277.

Le nom donné aux phages isolés du millésime 2013 est précédé par la lettre OE, suivi du chiffre 33 (origine de l'échantillon) et de deux ou trois lettres désignant le type de cépage du vin utilisé (**Tab. V**). Pour un échantillon où plusieurs morphotypes de phages de lyse sont présents, les noms des phages sont ajoutés d'un chiffre pour les distinguer. Ainsi, les phages OE33CS1 et OE33CS2 correspondent à deux phages de morphotypes différents isolés d'un cépage de Cabernet Sauvignon en Aquitaine.

Dans le cas des phages induits de souches lysogènes, le phage est nommé avec le nom de la souche et des deux lettres MC pour identifier l'agent inducteur qui est la mitomycine C. Le tout est précédé par la lettre  $\phi$ . Ainsi le phage induit de la souche IOEB 0608 s'appelle  $\phi$ 0608MC.

Pour faciliter la lecture des résultats, les prophages de chaque souche sont nommés comme suit : nom de la souche suivi d'une lettre qui catégorise le type de prophage.

### 1.2.6. Mise en conservation des phages

Les lysats phagiques sont conservés à 4 °C (sans ajout de chloroforme) pour une utilisation immédiate des stocks. Pour une conservation plus longue, les lysats sont congelés à -20 °C après ajout de 15 % de glycérol (v/v).



### **1.3. Caractérisation des bactériophages**

#### **1.3.1. Concentration des stocks par précipitation au PEG en vue de leur observation en microscopie électronique**

Le lysat phagique initial correspond à un volume de 25 ml et présente une concentration proche de  $10^9$  UFP/ml. Il est systématiquement filtré extemporanément sur membrane 0,22  $\mu$ m. L'échantillon est alors traité à la DNase et à la RNase (aux concentrations finales de 1  $\mu$ g/ml) à 37 °C pendant 30 min. Cette étape est suivie de l'addition de NaCl (1M concentration finale) puis de Poly Ethylène Glycol (PEG 6000; 10 % p/v). L'addition de PEG est réalisée progressivement, sous agitation modérée et à 4 °C. Après dissolution complète, la suspension sirupeuse est répartie dans des pots de centrifugation qui sont gardés à 4 °C pendant 12 h au minimum afin de permettre la précipitation des particules virales. Les bactériophages sont récupérés par centrifugation (11000 *g* ; 10 min) à 4 °C. Le culot est soigneusement égoutté et recouvert de tampon TM (50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; MgSO<sub>4</sub> 10 mM). Le volume de TM est ajusté pour permettre une concentration d'un facteur 25 par rapport au volume du lysat initial. Après 30 minutes de contact, le culot est repris soigneusement par une série d'aspirations-refoulements douce, en évitant les à-coups. Deux lavages successifs sont alors appliqués en utilisant un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) (v/v).

La coloration et l'observation des particules virales ont été réalisées au Centre de Microscopie de l'Université de Bordeaux (Bordeaux Imaging Center – CNRSUMS 3420). La coloration négative des échantillons est obtenue en déposant 10  $\mu$ l du lysat concentré sur une grille (cuivre 200 mesh formvar carbone, Polysciences, Allemagne). Après 30 sec de contact, l'excès de liquide est éliminé en inclinant et en déposant la tranche de la grille sur papier filtre. Un volume de 10  $\mu$ l de solution d'acétate d'uranyle à saturation dans l'eau est déposé sur la grille pendant 30 sec. Après élimination de l'excès de colorant et séchage, l'observation est effectuée sur un microscope électronique à transmission Hitachi H7650 à 80 kV en haute résolution.



### 1.3.2. Spectre de résistance

Le lysat phagique est dilué de façon décimale. Sa concentration est déterminée en parallèle sur la souche de propagation utilisée pour produire le stock, et sur la souche dont le spectre doit être évalué. La résistance d'une souche à un phage est déterminée par un rapport de concentrations, il est nommé EOP pour « efficiency of plating ». Il est calculé en divisant le titre en phages obtenu sur la souche à tester par le titre obtenu sur la souche de propagation du virus. Les résultats sont analysés comme suit :

- un rapport proche de 1 indique que la souche testée propage aussi bien le virus que sa souche de propagation.
- un rapport supérieur à 1 indique que la souche testée propage mieux le phage que sa souche de propagation habituelle.

Dans ces deux premiers cas, la souche testée est dite sensible ou encore permissive.

- Un rapport nettement inférieur à 1 au contraire démontre une résistance de la souche testée au phage.

### 1.3.3. Adsorption

L'adsorption est la première étape du cycle infectieux chez les bactériophages. Elle constitue la condition nécessaire pour aboutir à une lyse bactérienne. Les mesures d'adsorption sont faites en présence de cations (MRS $\phi$ ) à 25 °C. Une culture bactérienne dans du MRS en phase exponentielle est diluée de façon à avoir une DO<sub>600nm</sub> de 0,2. 1 ml de la culture est centrifugé (10000 g , 5 min), le culot est récupéré dans 900  $\mu$ l de MRS $\phi$  puis gardé à la température adéquate 20 °C ou 25 °C en fonction des conditions d'adsorption à tester. Le lysat phagique test, préalablement ramené à température ambiante est ajouté de façon à créer un rapport initial phage/bactérie (appelé ultérieurement MOI, pour multiplicity of infection) de 0,01. Ceci représente à ce stade une quantité de phages proche de  $4 \times 10^6$  UFP. Le mélange est immédiatement dilué au millième, en transférant tout le volume dans 9 ml de MRS $\phi$  (25 °C) et 500  $\mu$ l de ce mélange dans 49,5 ml de MRS $\phi$ . La dilution est répartie



ensuite en tubes de 5 ml à raison de 2,5 ml par tube qui sont placés à 25 °C. Un tube est prélevé à intervalle régulier, son contenu est filtré à travers une membrane PES de 0,45 µm, et le titre des phages non adsorbés est déterminé par la technique de la double-couche à partir de ce filtrat. Les résultats sont exprimés en pourcentage de phages adsorbés en fonction du temps. Le temps nécessaire pour un taux d'adsorption optimal sera utilisé pour les expériences de "one-step growth"

#### **1.3.4. One-Step growth**

Dans cette expérience, les phages sont mis en contact des cellules bactériennes dans des conditions favorisant une adsorption efficace. A l'issue de cette étape d'adsorption, une centrifugation douce permet d'éliminer le surnageant contenant la majorité des phages non adsorbés. Le culot cellulaire contenant les cellules infectées, ou non, est remis en suspension dans du milieu afin que les phages adsorbés poursuivent leur cycle et libèrent de nouvelles particules néosynthétisées dans le milieu. La concentration en phages libres est donc faible en début d'expérience (post adsorption) et augmente lors de la lyse finale des cellules.

Les mesures d'adsorption sont réalisées en bouillon MRSϕ et toutes les étapes sont menées à la température de 25 °C. Une culture bactérienne en phase exponentielle est diluée de façon à avoir une  $DO_{600nm}$  de 0,2. Un volume de 1 ml de la culture est centrifugé (10000 g, 5 min). Le culot obtenu est remis en suspension dans 900 µl de MRSϕ et conservé à 25 °C. Le lysat phagique est préalablement amené à température ambiante, puis un volume de 100 µl est ajouté aux cellules de façon à créer une MOI de 0,01. Le mélange est incubé à 25 °C pendant 1 heure.

A l'issue de l'étape d'adsorption, le mélange bactéries-phages est centrifugé (10000 g, 5 min) afin d'éliminer les phages non adsorbés. Le culot est alors repris dans un volume de 1 ml de MRSϕ et immédiatement dilué au millième grâce à deux dilutions successives. L'échantillon (1 ml) est d'abord transféré dans 9 ml de MRSϕ (adapté à 25 °C). Un volume de 500 µl de ce mélange est prélevé et ajouté à un volume de 49,5 ml de MRSϕ préalablement incubé à 25 °C. Le mélange est réparti à raison de 2,5 ml par tubes et ils sont placés à 25 °C. Les concentrations théoriques en bactéries et en phages libres au départ de l'expérience



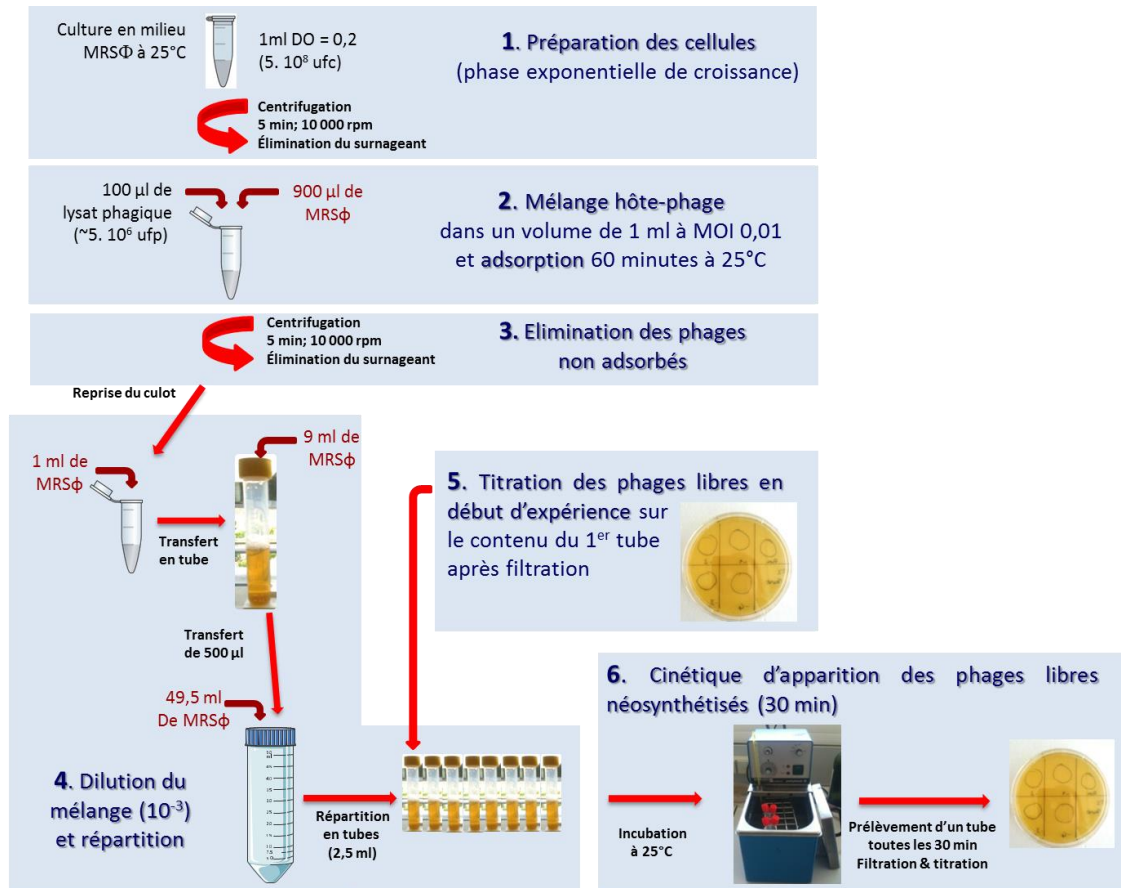


Figure 16. Les différentes étapes du protocole de "one-step-growth".

sont proches de  $5 \times 10^4$  UFC et  $5 \times 10^2$  UFP par tube. Immédiatement un tube est prélevé, filtré et la concentration en phages libres (non adsorbés) est déterminée par la technique de la double-couche. Cette valeur est faible car la majorité des phages non adsorbés ont été éliminés au préalable du mélange réactionnel. Les autres tubes seront ensuite prélevés à intervalles réguliers de 30 min. Leur contenu sera filtré et la concentration en phages libres déterminée. La **figure 16** présente les différentes étapes du protocole de "one-step-growth".

Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe représentant la quantité de phages libres (= non adsorbés) dans la culture en fonction du temps. La concentration en phages libres est faible au départ de l'expérience et stagne pendant un laps de temps nommé latence. Puis les phages adsorbés avec succès pendant la phase d'adsorption se répliquent et lysent les cellules, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en phages dans le surnageant, suivi par un plateau. Le nombre de particules libérées par phage est obtenu grâce au rapport entre la concentration initiale de phages pendant la période de latence et la concentration de phages dans la culture après la lyse.

### 1.3.5. Stabilité des particules virales

La persistance des phages lors de différentes situations de contraintes a fait l'objet de plusieurs manipulations. Les conditions de stress ont été créées en diluant des stocks phagiques concentrés dans du milieu MRS modifié à température ambiante, ou bien dans du milieu standard (MRS et/ou milieu « jus de raisin ») incubé ultérieurement à forte ou à basse température. La survie des particules dans le vin à 20 °C et en froid positif 4 °C et 8 °C a été également évaluée.

Dans tous les tests mettant en œuvre une contrainte chimique, les conditions initiales de contrainte ont été obtenues en diluant les stocks phagiques au 1/20ème dans le milieu stressant.

Lorsque la manipulation visait à comparer la cinétique de survie de phages différents dans un même essai, il a été difficile de disposer de stocks ayant des concentrations initiales identiques. Les valeurs variaient de  $10^7$  à  $10^9$  UFP/ml. Pour pallier ce problème et pouvoir



comparer les cinétiques de phages différents, une présentation des résultats en utilisant le facteur de réduction logarithmique (RF) a été privilégiée. Le RF associé à un stress donné correspond au logarithme décimal ( $\text{Log}_{10}$ ) du rapport existant entre la concentration initiale et la concentration résiduelle mesurée à la fin d'application du stress. Plus le facteur est élevé, plus la population virale infectieuse est inactivée par la contrainte testée.

- *Survie pendant un stockage en froid positif*

La stabilité (ou survie) des particules virales pendant leur stockage à 4 °C et 8 °C est testée dans les deux milieux de culture utilisés au cours du travail, à savoir le MRS et le milieu au jus de raisin. L'expérience est également menée sur un vin rouge (Merlot; 13,1 % d'alcool; pH = 3,61).

- *Survie en milieu MRS aux contraintes acide et thermique*

Le stress acide est évalué à température ambiante dans un milieu MRS dont le pH est abaissé à 3,5. La concentration résiduelle est évaluée par des prélèvements réguliers effectués sur une période de 27 heures. L'inactivation à la chaleur est étudiée en chauffant le stock viral pur pendant 15 min à des températures allant de 40 °C à 80 °C.

- *Survie en milieu vin à température ambiante*

La stabilité des particules virales dans du vin rouge (Merlot du pays d'Oc, pH = 3,7) et du vin blanc (Chardonnay du pays d'Oc, pH = 3,47) est suivie à 20 °C. Le RF est calculé pour chaque type de phage testé à plusieurs intervalles (6 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h et 72 h).

### **1.3.6. Effets des polyphénols sur les interactions phage/hôte bactérien**

L'activité lytique des phages est mesurée en présence de différents polyphénols : le resvératrol, la quercétine et l'épicatéchine. Les solutions mères de polyphénols sont préparées dans de l'éthanol absolu, et sont testées à des concentrations finales compatibles avec celles trouvées dans les vins (25 à 100 µg/ml).



Pour chaque essai, une culture en début de phase exponentielle est préparée et divisée en deux volumes. Le premier est additionné de polyphénols et le second reçoit le même volume d'éthanol sans le composé polyphénolique. Chaque volume est ensuite lui-même divisé en deux. Une moitié est infectée avec le phage (MOI de 0,01) et l'autre non. Les quatre échantillons sont incubés à 25 °C pendant 120 h et la  $DO_{600nm}$  est mesurée à intervalles réguliers. La concentration finale de phages dans les différents tubes est déterminée par la technique de la double-couche et comparée entre elles pour déterminer la différence d'efficacité de l'infection en présence ou non de polyphénols. Deux essais indépendants ont été réalisés.

## **1.4. Obtention de clones résistants aux bactériophages**

### **1.4.1. Isolement de dérivés lysogénisés par un phage d'intérêt**

La souche sensible IOEB S277 a été lysogénisée par différents phages. Dans un premier temps le lysat phagique est dilué et sa concentration est évaluée par la technique de double-couche en utilisant la souche IOEB S277 comme hôte. La dilution montrant des plages troubles individualisées est repérée. Quelques plages troubles sont choisies et un cylindre central est soigneusement excisé à l'aide d'un cône stérile, puis inoculé dans 5 ml de MRS. Après incubation à 25 °C, l'apparition d'un trouble dans le milieu traduit la croissance bactérienne des bactéries présentes dans la plage. Une aliquote de cette culture est étalée sur une gélose « jus de raisin ». Des colonies (~ 10) sont récupérées et chacune est inoculée dans un milieu MRS liquide. La résistance des bactéries vis-à-vis du phage utilisé dans le protocole de lysogénisation est vérifiée par la technique de la double-couche (en spots). L'intégration du prophage est ensuite vérifiée par PCR grâce à des amorces spécifiques de chaque type de phage ciblant l'intégrase et le site *attB*.

### **1.4.2. Obtention de mutants spontanés résistants à des phages virulents**

Des clones résistants sont créés à partir d'une souche sensible. La souche sensible est infectée avec un phage virulent à une MOI de 0,01. L'apparition de trouble dans la culture



bactérienne après l'obtention d'une lyse complète est observée dès six jours. Une numération bactérienne est alors effectuée sur un milieu gélosé « jus de raisin », et plusieurs colonies sont isolées afin de caractériser les éventuelles résistances acquises ainsi que leur éventuel statut lysogène. Une approche de typage par VNTR (paragraphe 2.5) des souches isolées est également effectuée. Plusieurs repiquages sont réalisés (trois dans cette étude) pour s'assurer de la stabilité du phénotype acquis. La résistance de ces clones aux phages est évaluée par la technique de la double-couche.

Dans l'éventualité où les BIMs ("Bacteriophage Insensitive Mutants") générés sont encore sensibles à certains des oenophages testés, un nouveau challenge en présence de ces phages inhibiteurs sera effectué comme décrit précédemment. Les clones résistants sont isolés et caractérisés par PCR afin de vérifier leur statut non-lysogène. Les profils VNTR sont réalisés afin de vérifier que les clones dérivent bien de la souche originale ajoutée en début de challenge. La résistance à différents phages dont celui ou ceux utilisés pour le challenge est mesurée.

#### **1.4.3. Analyse de colonies présentant une pigmentation différente après infection par un phage**

Au cours de l'isolement de BIMs, l'apparition de colonies présentant une pigmentation rouge sur le milieu jus de raisin a été observée dans les essais. Les colonies issues du témoin sans phage ne présentaient pas cette pigmentation dans les mêmes conditions de culture. 60 colonies rouges ont été récupérées avec 150 µl de méthanol (MeOH) et 1 % d'acide formique (condition 1). Un contrôle a été effectué avec 60 colonies blanches reprises dans les mêmes conditions. Des lots identiques de colonies rouges ou blanches ont été analysés de la même façon avec 150 µl d'acétone (condition 2). Les échantillons ont été homogénéisés et soumis à une sonication de 20 min. Après une centrifugation (3000 g, 5 min), le surnageant a été récupéré. Le surnageant correspondant à la condition 1 a été conservé à 20 °C. Celui correspondant à la condition 2 a été évaporé puis remis en suspension avec 150 µl de MeOH. Les extraits ont été filtrés au travers d'une membrane en nylon de 0,45 µm, puis analysés par chromatographie liquide (détecteur UV à barrette de diodes) couplée à un spectrophotomètre de masse (LC-DAD-MS) en





collaboration avec l'équipe GESVAB (Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique).

## 2. Caractérisation moléculaire des génomes bactériens et viraux

### 2.1. Extraction d'ADN

#### 2.1.1. ADN génomique bactérien

Le matériel de départ correspond à des cellules en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$ ) cultivées en milieu MRS liquide. Selon la finalité de l'extraction d'ADN l'une des deux techniques ci-après est utilisée.

- *A l'aide d'un kit commercial d'extraction:*

L'ADN total des bactéries est purifié à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique Wizard Genomic DNA purification kit disponible chez Promega. Cette méthode rapide permet l'obtention d'ADN de bonne qualité directement utilisable pour différentes applications (PCR, qPCR).

Un volume de 1,5 ml de culture est centrifugé (10000 *g*, 5 min) et le culot cellulaire obtenu est mis en suspension dans 600  $\mu$ L d'une solution EDTA 50 mM pH 8 contenant 10 mg/ml de lysozyme puis incubé 1 h à 37 °C pour permettre la dégradation des parois. Les protoplastes sont récupérés par centrifugation (10000 *g*, 2 min) et repris dans un volume de 600  $\mu$ L de solution de lyse (« Nuclei lysis solution »). La suspension est incubée à 80 °C pendant 5 min pour optimiser la lyse des protoplastes et la libération des acides nucléiques, puis elle est ramenée à température ambiante. La suspension est traitée à la RNase A (3  $\mu$ L de la solution concentrée), homogénéisée par retournement et incubée à 37 °C pendant 30 min. Les protéines et autres débris cellulaires sont précipités en ajoutant 200  $\mu$ L de solution de précipitation (« Protein precipitation solution »). Le mélange est alors homogénéisé au vortex pendant 20 sec. L'échantillon est ensuite placé 5 min dans la glace, puis centrifugé à



10000 g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube contenant 600 µL d'isopropanol et la précipitation de l'ADN s'obtient en réalisant plusieurs mélanges par inversion du tube. Après centrifugation (10000 g, 2 min), le culot est lavé plusieurs fois avec 600 µL d'éthanol à 70 % (un minimum de deux lavages est requis). Le culot est séché sous vide pendant 10 min et repris dans 20 µL d'eau ppi (pour préparations injectables). L'ADN est réhydraté pendant une nuit à 4 °C avant d'être utilisé ou stocké à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

- *Immobilisation d'ADN sur filtre pour une application PCR (technologie Whatman FTA):*

La technologie Whatman FTA brevetée est une technique simple et rapide pour l'extraction, la purification et la conservation des acides nucléiques de diverses matrices. Elle consiste à déposer l'échantillon sur une carte FTA contenant l'ensemble des composés chimiques nécessaires à la lyse cellulaire, la dénaturation des protéines et la protection du matériel génétique contre les nucléases, l'oxydation et les rayons ultra-violet. Les acides nucléiques libérés sont piégés dans les fibres de la matrice et les filtres peuvent être directement utilisés pour diverses applications de biologie moléculaire et stockés à température ambiante pour de longues périodes. Dans cette étude, la technologie Whatman FTA est utilisée dans le but de vérifier rapidement l'espèce, et le statut lysogène par PCR des isolats. Les cellules sont collectées sous forme de colonies sur milieu gélosé, ou de cultures en milieu liquide.

Une colonie de *O. oeni* est reprise dans 20 µl d'eau ultra pure stérile puis un volume de 8 µl de la suspension est déposé sur la carte FTA. Après un temps de séchage d'une heure à température ambiante, une pastille de 1,2 mm de diamètre est découpée à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Uni-Core Punch), puis transférée dans un tube contenant 100 µl de tampon de purification (FTA Purification Reagent). Après 5 min de contact, deux lavages de la pastille à l'eau ultra pure sont réalisés de la même façon. Le mélange des réactifs de PCR peut alors être directement ajouté.

Le même protocole peut être directement appliqué à une culture bactérienne liquide. Pour une culture dont la  $DO_{600nm}$  est supérieure à 0,2, une dilution au 10<sup>ème</sup> dans



l'eau physiologique est conseillée. Un volume de 8 µl de la culture pure ou de sa dilution est déposé sur la carte FTA. Les étapes suivantes sont les mêmes que pour l'extraction à partir d'une colonie.

### 2.1.2. ADN phagique

Le protocole utilisé a été adapté de celui décrit par Sambrook & Russell (2001). L'extraction est effectuée à partir d'un volume de lysat phagique de 25 ml ( $\geq 10^8$  UFP/ml). Les particules phagiques sont précipitées par ajout de PEG en présence de NaCl suivant le protocole décrit précédemment. Après centrifugation, le culot contenant les particules virales est mis en suspension dans 500 µl de tampon TM, et traité à la DNase et la RNase. Une extraction au chloroforme (v/v) est ensuite réalisée. Après centrifugation (13000 g, 5 min), la phase aqueuse est récupérée, additionnée de protéinase K (50 µg/ml), d'EDTA (20 mM) et de SDS (0,5 %) et incubée à 65 °C pendant 15 min. La précipitation des protéines est obtenue par ajout de KCl 0,5 M, suivie d'une incubation de 30 min à 4 °C. Après une centrifugation (13000 g, 15 min) le surnageant est transféré dans un nouveau tube et deux extractions successives (v/v) sont réalisées par les mélanges phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (25 :24 :1) puis chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1). Après centrifugation (13000 g, 10 min), l'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par ajout de deux volumes d'éthanol absolu suivi d'une incubation de 30 min dans la glace. Après une centrifugation de 30 min à 13000 g, le culot d'ADN est lavé par 200 µl d'éthanol à 70 %, puis centrifugé 15 min à 13000 g. Cette étape est répétée deux fois. Le surnageant éliminé, le culot est séché pendant 10 min puis repris dans 50 µl d'eau ppi.

## 2.2. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Les ADN viraux sont digérés par l'action d'enzymes de restriction à des fins de comparaison. L'ADN (environ 200 ng) est digéré en présence de 20 unités d'enzyme de restriction pendant 1 h à 37 °C. Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées lors de cette étude : *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, *BamHI* et *BglII*. La présence d'extrémités cohésives

**Tableau VI. Liste des amorces utilisées dans cette étude.**

Nom	Gène cible ou région amplifiée	Séquence (5' --> 3')	Amplicons (pb)
Oo1	Enzyme malolactique ( <i>mleA</i> )	GTGCCGCTTTTTGGATATTA	430
Oo2		AGCAATTTTATCTTTATAGCT	
<b>Détection des oenophages</b>			
Int <sub>A</sub> f	Intégrase de type A	CGAAGTTTTGACTGGAAAAGAAA	273
Int <sub>A</sub> r		TTGAGCGAAGCTGCTATAAGAAC	
Int <sub>B</sub> f	Intégrase de type B	AGTTACCACCAAAGGCCATAAAC	443
Int <sub>B</sub> r		GCTCTGACGACTTACCAGCTTTA	
Int <sub>C</sub> f	Intégrase de type C	GGCTATGACGCAGGGCGTGG	426
Int <sub>C</sub> r		TGACGGGACGTGCTGGCAAG	
Int <sub>D</sub> f	Intégrase de type D	CGGAAAATATTATCAAGCACGAG	343
Int <sub>D</sub> r		TTCAGCGTGATCTTTACAAAAT	
Endo_f	Région conservée de l'endolysine chez	GCTTCTAAATGGTCGACTGG	447
Endo_r	tous les oenophages/utilisée pour la qPCR	GGCATTITTTAATCCATTTAA	
<b>Détection de la lysogénie chez <i>O. oeni</i></b>			
Att <sub>B</sub> Af	Site d'insertion vide des phages à Int <sub>A</sub>	CTCCATGGTCAAGTGGCTAAG	145
Att <sub>B</sub> Ar	(OEOE_t0506 tRNA <sup>Glu</sup> )	AAAGCATCCACCCCTTAATTGG	
Att <sub>B</sub> Bf	Site d'insertion vide des phages à Int <sub>B</sub>	CTTTAGGCTTTGTTTCGTGGA	730
Att <sub>B</sub> Br	(OEOE_t0851 tRNA <sup>Leu</sup> )	AAAATTTATGGGCCATTCGT	
Att <sub>B</sub> Cf	Site d'insertion vide des phages à Int <sub>C</sub>	AGCAATGCCCTTTAACTCA	337
Att <sub>B</sub> Cr	(OEOE_t0685 tRNA <sup>Lys</sup> )	TTGCGCTATACGCACCATAG	
Reg1f	Site d'insertion vide des phages à Int <sub>C</sub> /cas	TACGAAGATGGTATTAAAGCGGTTA	1275
Reg1r	d'absence de la région de 5,2 kb (Bon et al., 2009)	TATCAAAATCAAGATCTTTTCCAA	
Att <sub>B</sub> Df	Site d'insertion vide des phages à Int <sub>D</sub>	GGCTAATGTTTGCCGGATTA	342
Att <sub>B</sub> Dr	(OEOE_t1359 – tRNA <sup>Leu</sup> )	CAAGCAGTTCGTCGGTTTTT	
Att <sub>B</sub> Df bis	Amorce alternatif pour amplifier le site d'insertion vide des phages à Int <sub>D</sub> : présence de 7 kb (cas AT	TGCTGCCAGCTAATAGCAAA	876
jonc <sub>D</sub>	Amorce utilisée avec Att <sub>B</sub> Df ou Att <sub>B</sub> Dr pour l'amplification de l'AttR des prophages de type D	ATGTGCCCGATAAAACTGTG	361
<b>Typage des oenophages de type D</b>			
9805_1f	Amplification d'une région de l' <i>orf</i> 15 du	ACACCGTTTCGCAGATTTTC	159
9805_1r	prophage D de la souche 9805	ACCATATTTTCCGTGCTGGA	
S13_1f	Amplification d'une région de l' <i>orf</i> 15 du	AGCAGATTTTCGACGAGGGTA	160
S13_1r	prophage D de la souche S13	ACCGTCATTTAATTCGCGTC	
S11_1f	Amplification d'une région de l' <i>orf</i> 16 du	AATCCGGTTCAGGGAACAAT	177
S11_1r	prophage D de la souche S11	GCTGCATTCGTTTAGCAACA	
thsp_f	Amplification de la deletion de 500 pb au	TCGACATCGTCCGACATTTA	1228/634
thsp_r	niveau du gène de "tail-host specificity"	ATATCGAGCACCCATGAACC	
HP_3f	Amplification de la 3 <sup>ème</sup> région variable des	TTCCAATAAAGGCCATGTT	1445/3214/5107
HP_3r	prophages de type D	TTGGATGCCCGTAATTTTCT	
MorDf	Amplification de la région conservée du	CATAATCCACAGCGGACCTT	545
MorDr	module distal	TGCTGACCTTTTTGGCTTCT	

éventuelles (site *cos*) ainsi que leur localisation sur les génomes viraux ont été recherchées. Pour ce faire, le mélange réactionnel, après action de l'enzyme de restriction, est séparé en deux volumes égaux. Le premier est soumis à un chauffage à 70 °C pendant 10 min, et conservé dans la glace jusqu'à son dépôt sur gel d'agarose. Le second volume est directement séparé sur gel d'agarose sans subir de chauffage.

### **2.3. Amplification d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase**

La réaction en chaîne de la polymérase ou PCR (« Polymerase Chain Reaction) est une technique très sensible permettant d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN défini. La technique repose sur l'hybridation à chaque extrémité du gène ou de la région à amplifier d'une paire de courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées chimiquement qu'on appelle « amorces », et d'une étape dite d'élongation qui correspond à la synthèse d'une nouvelle matrice par l'ADN polymérase à partir des amorces définies. Un chauffage de l'ADN double brin provoque la séparation de l'ADN double brin qui est ainsi accessible pour une hybridation des amorces. La PCR se résume donc en trois étapes répétées 25 à 35 fois : une dénaturation de l'ADN double brin, une hybridation des amorces avec leurs sites de liaisons et enfin une élongation par l'ADN polymérase.

#### **2.3.1. Design et synthèse des amorces**

Le design des différents couples d'amorces est réalisé avec le logiciel primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). La liste des amorces utilisées lors de cette étude est présentée dans le **tableau VI**. Leur synthèse est effectuée par la société Eurofins Genomics.

#### **2.3.2. PCR classique**

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un appareil thermocycler iCycler (Bio-Rad). Elles se déroulent en 30 cycles, chaque cycle étant constitué d'une étape de dénaturation de 30 sec à 95 °C, une hybridation des amorces pendant 30 sec à une



**Tableau VI (suite). Liste des amorces utilisées dans cette étude.**

Nom	Gène cible ou région amplifiée	Séquence (5' --> 3')	Amplicons (pb)
<b>Typage des oenophages de type B</b>			
E2HT6f	Amorce ciblant les gènes de la capsid et de	TTGGATAAGTACCTTTTTTCAGTA	2611
E2HT8'bisf	la protéine portale du phage $\phi$ 10MC	TCAATGCTCATTATTCTTGCAATATT	
E3HT10r	Amorce ciblant le gène de "tail length tape	ACGGGACAGACCGTTAACC	1772
E2HT1r	measure du phage $\phi$ 10MC	AAATAACAAGGAGTTCAGTTTT	
E2HT7r	Amorce ciblant les gènes <i>terL</i> et de la	AATATTGTTAAAAAATCGTG	219
E2HT8'bisf	protéine portale du phage $\phi$ 10MC	TCAATGCTCATTATTCTTGCAATATT	
<b>Typage des oenophages de type A</b>			
C1_f	Amplification du 1 <sup>er</sup> type de répresseur	AAAAGCATGATTTCCCGTTG	241
C1_r	putatif	TGGCAATTCTATCAGGCACA	
C2_f	Amplification du 2 <sup>ème</sup> type de répresseur	CAATGGATCAGCTTGAGAA	193
C2_r	putatif	GGTGCATCCATAGCAACTGT	
C3_f	Amplification du 3 <sup>ème</sup> type de répresseur	GAAAATGCAGTCCCGAAAG	226
C3_r	putatif	CGCACGGTTTTATCAAGACA	
Rep1_f	Amplification du 1 <sup>er</sup> type de protéine de	TGAACAGTGACGAAAAACGA	505
Rep1_r	réplication putative	TGCTTCTCCTCTGTCTTTTCTT	
Rep2_f	Amplification du 2 <sup>ème</sup> type de protéine de	ATTTGGATTGCCAGACGAAG	221
Rep2_r	réplication putative	CTTTCGCAAGCTTAGCGTCT	
TerS1_f	Amplification du 1 <sup>er</sup> type de la petite sous-	TGTCATCCAGTCACGGGTA	206
TerS1_r	unité de la terminase	TGATCTGCTCGGCAGTAGAA	
TerS2_f	Amplification du 2 <sup>ème</sup> type de la petite sous-	ACACGCTGGAAGGAAAAGAA	178
TerS2_r	unité de la terminase	TCTTAATTCGGGCACCAAAG	
TerS3_f	Amplification du 3 <sup>ème</sup> type de la petite sous-	TTCAAGATTCCACCGAAAG	169
TerS3_r	unité de la terminase	TCTTTCGGCTGAACGATTTT	
TerS4_f	Amplification du 4 <sup>ème</sup> type de la petite sous-	GCCATGTGGAGAAAAATCGT	206
TerS4_r	unité de la terminase	TAACCAGCAAAATCCGTTCC	
Tmp1_f	Amplification du 1 <sup>er</sup> type de "tail length tape	AGCCAACGCAATGGTAAAAA	790
Tmp1_r	measure"	CGCCCATTTCTTAGTCATT	
Tmp2_f	Amplification du 2 <sup>ème</sup> type de "tail length tape	GGTTGGATCGGAAATTGCTA	247
Tmp2_r	measure"	TGCAGCTATGGCTGTAATCG	
Tmp3_f	Amplification du 3 <sup>ème</sup> type de "tail length tape	ATGGTCAACACGATCAACGA	183
Tmp3_r	measure"	CGTTACGGCCTGAATTTGTT	
Tmp4_f	Amplification du 4 <sup>ème</sup> type de "tail length tape	GCGGGATTGCTGGATTATTA	231
Tmp4_r	measure"	CGAAAATGCTTGCTTTCACA	
Doc_f	Amplification d'une région du gène <i>doc</i> dans	TAACGGCCTTGATAGCGTTT	256
Doc_r	le module distal	TTGAGGCATCCTTCCTCAG	

température comprise entre 50 et 60 °C (selon le T<sub>m</sub> des amorces) et une étape d'élongation à 72 °C (1 min pour 1 kilobase). Toutes les réactions sont précédées d'une étape initiale de dénaturation (95 °C pendant 3 min) et d'une étape finale d'élongation (72 °C pendant 10 min).

Le mélange réactionnel utilisé pour l'amplification contient 1 µL de chaque amorce (5 pmol/µl), 4 µL de mix PCR prêt à l'emploi (Taq 5X Master Mix, New England Biolabs), 1 µl de matrice ADN et une quantité suffisante d'eau ppi pour (qsp) un volume final de 20 µl.

La matrice d'ADN peut correspondre à:

- un cylindre excisé d'une carte Whatman FTA et traité comme précédemment indiqué ;
- un extrait d'ADN bactérien ou viral (environ 25 ng) ;
- des particules phagiques en suspension dans du milieu MRS (un minimum de 20 UFP par réaction est requis) ;
- une colonie lysée par traitement par congélation/décongélation: la technique consiste à mettre en suspension une colonie bactérienne dans 50 µl d'eau ultra pure stérile à l'aide d'un cure-dent stérile. Un cycle de congélation à -20 °C/décongélation permet la lyse de la paroi bactérienne et la libération des acides nucléiques. La suspension décongelée (1 µl) peut être directement utilisée pour des PCRs de routine.

### **2.3.3. PCR quantitative en temps réel**

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) repose sur le même principe que la PCR classique et grâce à l'ajout d'un agent intercalant (le SYBR Green), elle permet de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment précis par détection de la fluorescence émise. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons). La mesure est réalisée par un appareil CFX 96 Real Time PCR Detection System de Bio-Rad. Plus le nombre de cibles initiales est grand dans un échantillon, moins il faudra de temps pour générer un signal de



fluorescence significativement supérieur au bruit de fond. Ce seuil se définit comme étant le  $C_T$  pour « threshold cycle » ou cycle seuil. Les valeurs de  $C_T$  sont donc proportionnelles à la quantité initiale de cibles disponibles pendant la phase exponentielle d'amplification.

Une étape supplémentaire de fusion des produits PCR permet de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Elle consiste en la dénaturation des produits formés par une augmentation progressive de la température de 70 à 90 °C (0,5 °C toutes les 5 sec).

La technique de qPCR a été appliquée afin d'évaluer rapidement la concentration des phages dans les échantillons, sans devoir attendre les résultats des expériences de double-couche (4 à 7 jours). L'efficacité de cette technique par rapport à la technique traditionnelle de la double-couche a été démontrée pour de nombreux phages (Anderson *et al.*, 2011).

Cette approche a été possible grâce à l'identification d'une région interne au gène codant l'endolysine phagique qui est conservée chez tous les oenophages. Le couple d'amorce (EndoF/R) ciblant cette région est utilisé pour les expériences de qPCR. Cette technique a aussi été évaluée pour la quantification des phages directement dans le vin.

#### (a) Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel utilisé pour l'amplification contient 1 µl de chaque amorce (5 pmoles), 1 µL de matrice d'ADN, 10 µL de mélange PCR prêt à l'emploi iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) et 7 µl d'eau de qualité biologie moléculaire. Les amplifications sont réalisées dans un appareil « MJ Mini Thermal Cycler » (Bio-Rad). La réaction se déroule en 35 cycles. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation de l'ADN (95 °C pendant 10 sec), d'une hybridation des amorces endolysine F et R (51 °C, 30 sec) et d'une phase d'élongation (72 °C, 30 sec). La mesure de fluorescence est réalisée lors de chaque phase d'élongation. Les 35 cycles sont précédés d'une étape de dénaturation initiale (95 °C, 3 min) et sont suivis d'une étape de dénaturation des produits amplifiés par une augmentation progressive de la température de 70 à 90 °C (0,5 °C toutes les 5 sec).

#### (b) Courbe standard sur stock phagique en milieu MRS (sans précipitation au PEG)

Afin de quantifier le nombre de particules virales dans un échantillon, il est nécessaire de disposer d'une courbe standard à partir de différentes suspensions virales



dont les concentrations sont connues. Cette courbe est établie à partir des valeurs de  $C_T$  obtenues lors de la qPCR. Une courbe standard est caractérisée selon son coefficient de régression ( $R^2$ ) et par son efficacité de PCR ( $E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$ ). Les critères de validité d'une gamme " standard " sont  $R^2 \geq 0,985$  et  $0,85 \leq E \leq 1$ . Les courbes standards ont été réalisées à partir d'un lysat phagique dont la concentration a été déterminée par la technique de la double-couche. Cette suspension est diluée de façon décimale et un volume de 1  $\mu$ l de chaque dilution a été utilisé comme matrice et soumis à la qPCR. Les valeurs de  $C_T$  obtenues pour chaque dilution ont été rapportées à la quantité initiale de particules phagiques présente dans le tube. La pente de la droite a été calculée ainsi que l'efficacité. La contribution d'éventuels ADNs libres présents dans le lysat phagique a été éliminée par un traitement préalable de l'échantillon à la DNase.

(c) Courbe standard sur particules inoculées dans le vin (après précipitation au PEG)

Pour appliquer la technique de quantification des phages sur une matrice complexe tel que le vin, une stratégie de précipitation des particules phagiques a été choisie. Les particules présentes dans un échantillon de vin sont récupérées par précipitation au PEG comme indiqué précédemment mais sans traitement DNase. Les particules précipitées sont reprises dans le tampon TM et traitées à la DNase et la RNase.

Afin d'obtenir une courbe standard, une gamme de dilutions décimales du lysat phagique testé en (b) est réalisée comme suit. Un volume de 1 ml des dilutions  $10^{-4}$  à  $10^{-7}$  est rajouté dans 24 ml de vin. Les particules phagiques de chaque échantillon de vin sont précipitées au PEG, récupérées dans le tampon TM et lavées 2 fois avec un mélange chloroforme/alcool isoamylique (v/v). Ces différents extraits sont utilisés pour la qPCR et ainsi obtenir les valeurs de  $C_T$  correspondantes. L'absence de phénomène d'inhibition par des composés du vin co-précipités est vérifiée en réalisant les qPCR sur plusieurs dilutions de chaque échantillon obtenu.



## 2.4. Migration des acides nucléiques par électrophorèse

### 2.4.1. Electrophorèse classique sur gel d'agarose

L'électrophorèse classique sur gel d'agarose est basée sur le principe que les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode lorsqu'un champ électrique est appliqué à ces derniers, et que la migration est proportionnelle au poids moléculaire de la molécule. L'agarose (de 0,8 à 1,2 % p/v selon la taille des fragments à analyser) est dissout à chaud dans du tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2M, Acétate 1M, EDTA 50mM pH 8). La visualisation des fragments d'ADN post-migration est réalisée sous UV grâce à l'ajout dans le gel d'un agent intercalant, le bromure d'éthidium à 0,2 µg/ml. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve remplie de TAE 1X. Les échantillons à analyser sont additionnés de 10 % v/v de bleu de charge (glycérol 50 %, TE 50 %, bleu de bromophénol 0,25 %) avant d'être chargés dans les puits. La migration est réalisée sous un voltage constant (90 V) pendant 45 min à 60 min. Les profils de migration sont visualisés par exposition à la lumière UV grâce au système d'imagerie Infinity Capt (Fischer Scientific, Bioblock). Des fragments de restriction de taille connue sont utilisés comme marqueurs de taille pour calibrer les gels d'agarose. Il s'agit de l'ADN du phage λ digéré par *HindIII*, du 100 bp DNA ladder et du 2 Log DNA ladder (0,1-10 kb) tous disponibles chez New England Biolabs.

### 2.4.2. Electrophorèse capillaire à puce

Le système MultiNA (Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis, Shimadzu) est utilisé pour l'analyse rapide de nombreux produits d'amplification. Il s'agit d'un système d'électrophorèse capillaire dont le principe est identique à celui de l'électrophorèse classique sur gel d'agarose. Son avantage repose sur l'automatisation de la migration, et la visualisation des résultats par électrophorégramme. De plus le système MultiNA utilise un très petit volume d'échantillon (> 1 µl) pour une analyse, contrairement à l'électrophorèse traditionnelle (< 10µl). La migration de l'échantillon se déroule au travers d'un capillaire contenant un tampon de séparation spécifique de la taille et du type de matrice (ADN ou ARN). Un fois injecté, l'échantillon marqué par un fluorochrome est soumis à un champ électrique élevé provoquant sa migration dans le capillaire. Lors de son passage





au travers d'un système émetteur/détecteur à fluorescence, la lumière émise par la molécule marquée est mesurée, enregistrée et transcrite en un signal visible, sous forme de pic, dans un électrophorégramme et sous forme de bande dans une image numérique de gel.

Le kit MultiNA DNA 1000 (Shimadzu) prêt à l'emploi est composé d'un tampon de séparation spécifique des fragments de 65 à 1371 pb et d'un calibrateur. Additionné à chaque échantillon lors de l'analyse, le calibrateur contient deux types de molécules, de faible et haut poids moléculaire, permettant la normalisation de chaque migration. Le fluorochrome SYBR Gold® 10 000X (Invitrogen) est ajouté à une concentration finale 1X dans le tampon de migration. Enfin, le marqueur de poids moléculaires phiX174-*Hae*III digest (Promega) est dilué 50 fois dans du TE pH 8. Le logiciel « MultiNA control » fournit toutes les quantités nécessaires de réactifs pour une quantité définie d'échantillons, et permet le lancement de l'analyse. Le logiciel « MultiNA Viewer » est utilisé pour visualiser et analyser les résultats.

## **2.5. Méthodes d'étude comparative des génomes bactériens**

### **2.5.1. Electrophorèse en champ pulsé**

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

Dans cette étude, la migration des fragments d'ADN génomique après digestion enzymatique (REA-PFGE, Restriction Enzyme Analysis – Pulse Field Gel Electrophoresis) est



utilisée pour la comparaison de différents clones de *O. oeni*. Le protocole suivi est celui mis au point au laboratoire (Gindreau *et al.*, 1997).

- *Préparation des cellules en bloc d'agarose*

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

- *Purification de l'ADN*

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

- *Digestion enzymatique de l'ADN*

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



- *Migration électrophorétique en champ pulsé et révélation des profils de restriction*

Immédiatement après l'étape de digestion enzymatique, le demi-plug est rincé dans du TE pH 8, et déposé délicatement sur gel d'agarose "spécial champ pulsé 1 %" (Pulse Field Certified Agarose, Bio-Rad). Un marqueur de poids moléculaire est également déposé (MidRange PFG Marker II, New England Biolabs). Les puits sont scellés par addition de gel d'agarose liquide 1 %. La migration se déroule dans un tampon TBE 0,5X (TBE 10X, Tris 890 mM ; acide borique 890 mM ; EDTA 20 mM pH 8) à 14 °C selon les conditions suivantes : temps de pulse de 1 – 25 sec, temps de migration de 22 h, voltage de 6 V/cm et angle de rotation de 120 °. Enfin, le gel est coloré dans 100 ml de TBE 0,5X supplémenté de 0,7 µg/ml en BET (Eurobio) pendant 15 min et visualisé sous lumière UV comme indiqué précédemment.

### 2.5.2. Profils VNTR

La méthode VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) est souvent utilisée pour le typage et l'identification de bactéries pathogènes qui sont peu ou difficilement différenciables par d'autres méthodes. Elle présente l'avantage d'être plus rapide et plus facile à réaliser. L'analyse par VNTR est une méthode PCR pouvant différencier les souches d'une espèce donnée, et repose sur la présence de séquences répétées, à des périodes variables, au sein du génome d'un organisme. Ces régions sont amplifiées grâce à des amorces PCR et les tailles d'amplicons sont propres à chaque souche. La méthode VNTR est un outil de typage génétique performant au sein de l'espèce *O. oeni*. Elle est plus discriminante que le typage par MLST ou par électrophorèse en champ pulsé. Elle est réalisée en PCR multiplex par l'amplification de 5 régions variables en tandem (TR) (Claisse & Lonvaud-Funel, 2012, 2013).

Chacune des cinq amorces sont marquées par un fluorochrome distinct. Pour chaque échantillon à analyser, deux réactions de PCR multiplex sont réalisées. Le premier mélange réactionnel (M<sub>1</sub>) contient les couples d'amorces TR 1 et TR 2 (5 pmol respectivement). Le second mélange (M<sub>2</sub>) est réalisé de la même manière et contient les couples d'amorces



marquées TR 3, TR 4 et TR 5 (2,5 pmol, 2,5 pmol et 5 pmol respectivement). Les amorces sont mélangées avec 5 µl du mix « à façon » Multiplex PCR Kit (QIAGEN) et un volume suffisant d'eau ppi, pour générer un volume final de réaction de 10 µl. Les deux mélanges sont soumis à un même programme PCR dans un thermocycleur (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad). Les paramètres sont : dénaturation à 95 °C pendant 15 min, suivi de 30 cycles de 94 °C pendant 30 sec, 62 °C pendant 90 sec et 72 °C pendant 90 sec ; et dernière étape de 30 min à 60 °C.

Les produits amplifiés dans les mélanges réactionnels M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> sont rassemblés, et dilués 40 fois et 60 fois respectivement. Pour ce faire, des volumes de 3 µl de M<sub>1</sub> et 2 µl de M<sub>2</sub> sont ajoutés dans 115 µl d'eau milliQ. 2 µl de ce mélange est additionné à 9 µl de formamide (Hi-Di™, Life Technologies). L'échantillon est traité par la société MWG-Eurofins-Operon (Institut Cochin France) qui détermine la séquence des amplicons. L'analyse des résultats se fait à l'aide du logiciel GeneMarker® (SoftGenetics) dans lequel a été ajouté un panel spécifique VNTR, afin de déterminer le nombre de répétitions de chaque TR. Les profils obtenus peuvent être comparés à une base de données disponible au sein de notre laboratoire, et contenant plus de 2500 profils.

## **2.6. Séquençage d'ADN**

La méthode de Sanger est ici utilisée pour le séquençage de courts fragments d'ADN (<1500 pb) générés par PCR. Les produits PCR obtenus et les amorces sont préparés et envoyés selon les recommandations de la société Eurofins-Genomics. La lecture et l'analyse des résultats de séquençage sont effectuées à l'aide du logiciel Bioedit ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)).



**Tableau VII. Caractéristiques générales des séquences génomiques de souches de *O. oeni*.**

Souches	Nombre de contigs	L50	N50	N50 ratio	Total bp	Nombre d'orfs	Numéro d'accession	Références
ATCC_BAA-1163	61	61665	10	311	1748994	1835	AZKL000000000	Lonvaud <i>et al.</i> , non publiés
AWRIB129	42	135603	5	311	1729193	1780	AAUV000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB202	36	137205	4	288	1840757	1914	AZLH000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB304	36	137195	4	288	1852239	1928	AZKB000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB318	26	241841	3	199	1808452	1879	AZJU000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB418	34	177870	4	255	1838155	1887	AZIP000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB419	46	135466	5	377	1793208	1861	AZKI000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB422	32	228430	3	309	1814530	1893	AZLE000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB429	58	85101	8	363	1927702	2042	ALAE000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB548	29	228488	3	251	1835383	1929	AZKF000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB553	32	229549	3	309	1759113	1814	AZKE000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB568	31	137199	4	209	1874865	1968	AZKH000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
AWRIB576	28	241903	3	233	1877204	1964	ACSE000000000	Borneman <i>et al.</i> , 2012
IOEB_0205	42	157775	4	399	1795037	1879	ALAJ000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_0501	38	162140	5	251	1826356	1892	ALAK000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_0502	39	140250	5	265	1822270	1883	AZLL000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_0607	122	140050	5	2855	1815356	1873	AZKJ000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_0608	41	108677	6	239	1812611	1882	AZJX000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_1491	42	96930	7	210	1772571	1852	AJTO000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_8417	65	95439	7	539	1842137	1907	AZJV000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_9304	137	79430	9	1948	1827658	1901	AJII000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_9517	56	86291	8	336	1743782	1824	AZJY000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_9803	36	146580	5	223	1833906	1889	ALAD000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_9805	57	138815	6	485	1843445	1912	AZKG000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_B10	42	108811	5	311	1779079	1841	AZLR000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_B16	45	108273	6	293	1793397	1875	AZLT000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_C23	47	93272	8	229	1837655	1941	AZLQ000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_C28	130	92742	8	1983	1804864	1905	AZLG000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_C52	48	101748	6	336	1903774	1946	AZLK000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_CiNe	60	63847	9	340	1790871	1863	ALAI000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_L18_3	44	90241	6	279	1735746	1790	AZLO000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_L26_1	26	154085	4	143	1794099	1860	AZJW000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_L40_4	61	121479	4	869	1731377	1800	AZKD000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_L65_2	39	105259	5	265	1776569	1850	AZLI000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_S277	69	63100	9	460	1741397	1798	AZLN000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_S436a	44	107495	5	343	1764184	1829	AJPT000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_S450	37	149059	5	237	1762120	1826	AZLS000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
IOEB_VF	48	107495	5	413	1782542	1854	AZLM000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
PSU-1	1	1780517	1	0	1780517	1878	ALAF000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S11	40	102852	6	227	1833247	1898	NC_008528	Mills <i>et al.</i> , 2005
S12	35	136768	6	169	1813617	1856	AZLI000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S13	66	67856	8	479	1814452	1870	ALAG000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S14	40	85103	5	280	1731907	1800	AZKC000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S15	37	101942	5	237	1740731	1784	AZHH000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S19	65	97002	7	539	1810386	1889	ALAH000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S22	43	141242	5	327	1810137	1883	AZJZ000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S23	50	84503	7	307	1805457	1859	AZKA000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S25	32	140671	5	173	1741301	1808	AZKK000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S28	46	90157	7	256	1843403	1924	AZLP000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
S161	35	108729	5	210	1789533	1850	AZLF000000000	Dimopoulou <i>et al.</i> , 2014
NRIC_0647*	27	261715	3	216	1839043	1849	soumis	
NRIC_0649*	16	285276	3	69	1825564	1832	soumis	
NRIC_0650*	16	282363	3	69	1785288	1790	soumis	

\*Souches appartenant à l'espèce *O. kitaharae*.

### 3. Analyse *in silico* des données génomiques

#### 3.1. Assemblage et annotation des génomes bactériens

Un premier panel de 17 génomes de *O. oeni* a été obtenu par la technologie 454 GS FLX Titanium (Roche), et les séquences ont été assemblées par l'équipe de la plateforme bioinformatique de la Génopole de Toulouse à l'aide du logiciel Newbler (<http://bioinfo.genotoul.fr/>).

Un second ensemble de 21 souches a été traité par la technologie Illumina par la société Macrogen (Séoul, Corée) à l'aide du logiciel SOAPdenovo 2.04. Ces opérations ont généré des génomes sous la forme de "draft". Leur annotation a ensuite été effectuée au laboratoire à l'aide du logiciel RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, [rast.nmpdr.org/](http://rast.nmpdr.org/)) (Aziz *et al.*, 2008).

Ce travail fait l'objet de la thèse de Hugo Campbell-Sills au laboratoire. Les génomes ont été rendus publiques en 2014 (Dimopoulou *et al.*, 2014).

Enfin les données de 12 génomes de souches séquencées par l'AWRI (Australian Wine Research Institute) ont été ajoutées à notre étude (Borneman *et al.*, 2010, 2012). Au total, un jeu de 50 génomes de *O. oeni* a été utilisé.

Les données relatives aux souches et aux séquences génomiques sont consignées dans le **Tableau VII**. Les différents contrôles qualité des séquences génomiques ont été effectués par les prestataires de service. Les outils d'assemblage utilisés ont généré les données sous forme d'ébauches ou "drafts" contenant de 19 à 144 contigs selon la souche (**Tab. VII**). Deux indicateurs sont utiles afin d'estimer la fragmentation du génome assemblé en contigs. La valeur L50 correspond à la taille du plus petit contig pour laquelle 50 % des séquences sont contenues dans des contigs plus grands. En d'autres termes, plus cette valeur est élevée, moins le génome est fragmenté. Le nombre N50 quant à lui, informe sur le nombre de contigs de taille supérieure à L50. Par exemple, quatre contigs de tailles supérieures à 154 085 pb couvrent la moitié du génome de la souche IOEB L26\_1, alors qu'il faut compter neuf contigs de tailles supérieures à 79 430 pb pour couvrir 50 % du génome de la souche IOEB 9304. Enfin, le nombre « N50 ratio » donne un autre aperçu de la qualité



d'assemblage des génomes en prenant en compte le rapport entre le nombre de contigs supérieurs à la valeur L50 et le total des contigs. Un paramètre « N50 ratio » faible indique la bonne qualité de l'assemblage. Les deux valeurs extrêmes ont été obtenues pour les génomes des souches IOEB 9304 et IOEB L26-1. L'assemblage du génome de la souche IOEB L26\_1 (N50 ratio = 143) est supérieur à celui de la souche IOEB 9304 (N50 ratio = 1948).

### 3.2. Extraction et ré-annotation des séquences prophagiques

Plusieurs programmes informatiques ont été utilisés : Phage finder (Fouts, 2006), PHAST (Zhou *et al.*, 2011) et Profinder (Lima-Mendez *et al.*, 2008). Ces programmes permettent de détecter les séquences d'origines virales grâce à des comparaisons avec les bases de données disponibles (gènes de phages ou de prophages connus), et de localiser les séquences utilisées lors de l'intégration site-spécifique des phages tempérés.

Les séquences nucléotidiques des prophages sont extraites des génomes de *O. oeni* disponibles sur la plateforme RAST. La ré-annotation des prophages est faite grâce au logiciel DNAMaster (<http://cobamide2.bio.pitt.edu/>) qui permet une annotation automatique, combinant la prédiction de gènes putatifs par les programmes GeneMark ([http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/genemark\\_prok\\_gms\\_plus.cgi](http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/genemark_prok_gms_plus.cgi)) et Glimmer ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer\\_3.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi)). La fonction protéique pour chaque ORF (Opening reading frame) est prédite en recherchant dans la base de données internationale NCBI des protéines homologues avec l'outil d'alignement BLASTp ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)).

### 3.3. Autres outils bioinformatiques

Pour toutes les analyses courantes des séquences génomiques (recherche de gènes, fonctions putatives), nous avons utilisé l'application Seed Viewer du logiciel RAST permettant une manipulation simple et rapide des données génomiques ([rast.nmpdr.org/seedviewer](http://rast.nmpdr.org/seedviewer)).



Les séquences nucléotidiques et protéiques de gènes sont comparées en utilisant le logiciel Mega 6 (Tamura *et al.*, 2011). Le logiciel permet la construction d'arbres phylogénétiques selon la méthode du « neighbor-joining ». Certains alignements ont été réalisés avec le logiciel COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) qui génère aussi un arbre phylogénétique selon la même méthode.

Le logiciel Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>) permet les alignements multiples de génomes prophagiques complets. Les séquences identiques sont représentées avec un code couleur. Les figures sont obtenues grâce à l'utilisation combinée du programme ACT (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/act/>) qui permet d'attribuer une couleur spécifique à chaque *orf*, et le logiciel Easyfig (Sullivan *et al.*, 2011). La visualisation de l'alignement de tous les génomes prophages dans cette étude a été possible grâce au logiciel JDotter (Brodie *et al.*, 2004).



## **RESULTATS ET DISCUSSION**





## **Chapitre I**

# **Inventaire *in silico* des prophages chez *O. oeni* et évaluation de leur inductibilité**



L'accès aux premières données de séquençage dans l'espèce *O. oeni* date de 2005, avec la publication du génome de la souche PSU-1 (Mills *et al.*, 2005), suivie par l'analyse de la souche ATCC BAA-1163 (Lonvaud *et al.*, non publiés). La réduction des coûts de séquençage a permis progressivement d'augmenter le nombre des génomes décryptés dans l'espèce (Borneman *et al.*, 2010, 2012 ; Dimopoulou *et al.*, 2014). L'accès aux génomes a été un réel tournant, les études étant jusqu'alors limitées par le manque d'outils génétiques dans l'espèce. *Oenococcus oeni* reste aujourd'hui une espèce peu transformable (Assad-García *et al.*, 2008).

Les outils de comparaison génomique sont aujourd'hui essentiels à la compréhension de la diversité génétique et phénotypique chez *O. oeni*. Ils offrent de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes d'adaptation de *O. oeni* à son environnement. Dans notre cas, ces nouveaux outils nous ont permis de revisiter les interactions hôte-phage, une thématique explorée au laboratoire dans les années 1990.

## 1. Panel de souches et données génomiques analysées

Les différents projets menés dans notre unité ont permis progressivement d'assembler une collection originale de souches appartenant à l'espèce *O. oeni*. Les souches isolées ont été caractérisées phénotypiquement. Leurs capacités d'adaptation aux contraintes associées au processus de vinification ont été évaluées en milieu modèle, ou dans le vin lors d'essais de micro-vinification (Favier, 2012; Dimopoulou, 2013). Les capacités d'adaptation aux stress acide ou éthanolique, leur capacité à synthétiser des polysaccharides, leur tolérance à la présence de tanins, ou encore leur aptitude à réaliser rapidement la FML ont été précisées, et comparées aux aptitudes développées par des souches exploitées commercialement. Un ensemble de souches présentant des aptitudes très variables, et dont le génotype (profils PGFE) différait de celui des souches commerciales a été retenu. Deux campagnes successives de séquençage ont permis de disposer de 38 génomes complets, publiés en 2014 (Dimopoulou *et al.*, 2014). Ces données ont été exploitées dans ce travail de thèse et les analyses *in-silico* ont été ensuite couplées à des

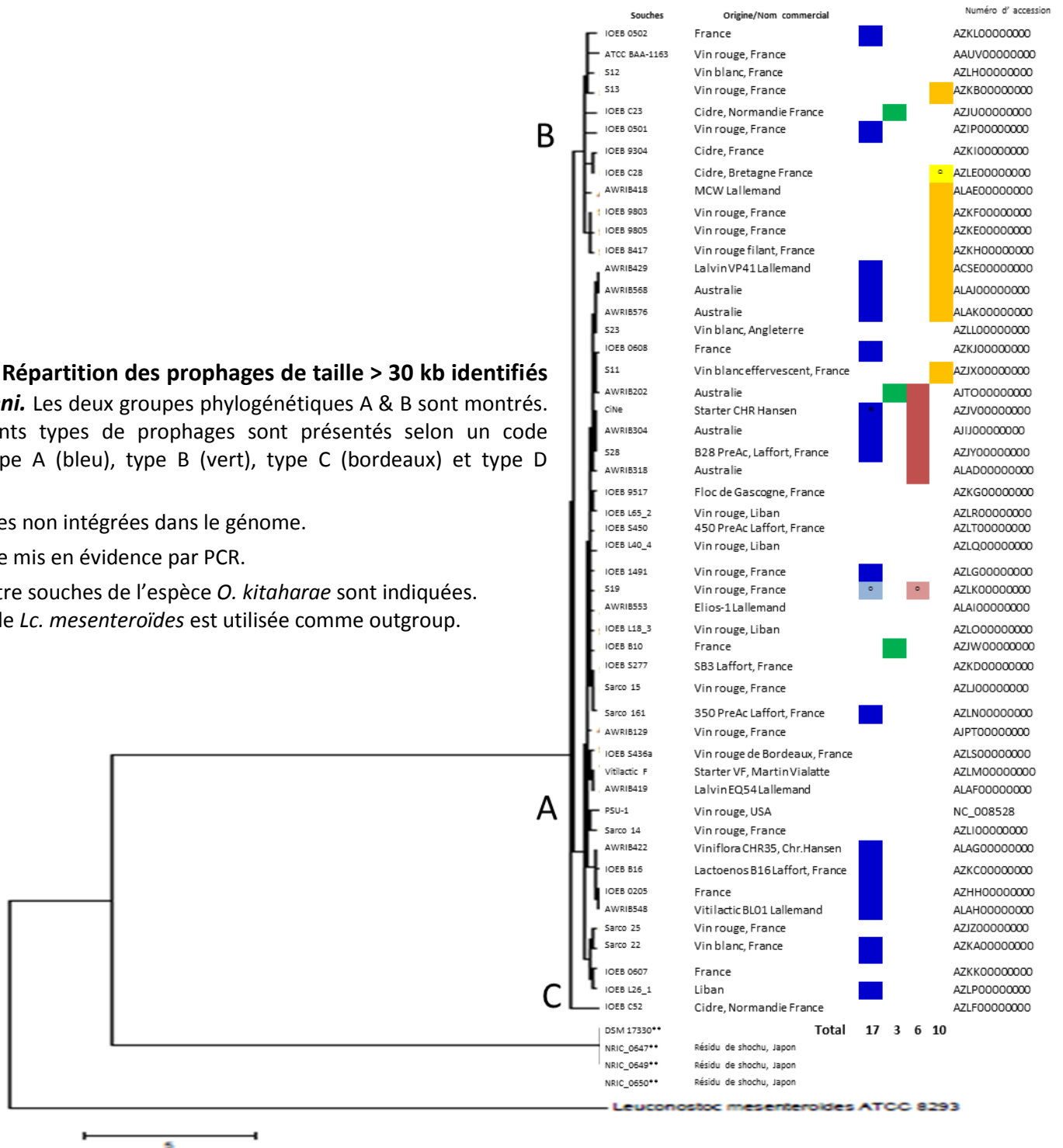
**Figure 17. Répartition des prophages de taille > 30 kb identifiés chez *O. oeni*.** Les deux groupes phylogénétiques A & B sont montrés. Les différents types de prophages sont présentés selon un code couleur: type A (bleu), type B (vert), type C (bordeaux) et type D (orange).

(<sup>0</sup>) Séquences non intégrées dans le génome.

(\*) Prophage mis en évidence par PCR.

(\*\*) Les quatre souches de l'espèce *O. kitaharae* sont indiquées.

La souche de *Lc. mesenteroides* est utilisée comme outgroup.



études de physiologie. Notre inventaire a également intégré les données correspondant à 12 souches décryptées indépendamment par l'équipe australienne de l'AWRI ("Australian Wine Research Institute") (Borneman *et al.*, 2012).

L'arbre phylogénétique obtenu par comparaison des données génomiques des 50 souches est présenté (**Fig. 17**). Il montre que le panel assemblé correspond à des souches génétiquement différentes. Les souches sont d'origines diverses, de par (i) la localisation géographique des échantillons à l'origine de l'isolement (régions viticoles françaises, USA, Liban), et (ii) le type de matrice utilisée (moûts, vins rouges et blancs, champagne, cidre ...). Elles incluent également les souches commerciales SB3, Lactoenos B16, B28 Preac, 450 Preac, et 350 Preac (Laffort) ; MCW, Lalvin VP41, Elios-1, Lalvin EQ54 et Vitalactic BL01 (Lallemand) ou encore IOEB CiNe (CHR Hansen).

## 2. Inventaire des séquences prophagiques

Les prophages peuvent subir des phénomènes d'insertion/délétion ou des réarrangements dans les génomes bactériens (Canchaya *et al.*, 2003; Bobay *et al.*, 2014). La littérature rapporte que les tailles des génomes des oenophages varient de 25 et 40 kb. L'analyse *in-silico* a porté sur les séquences ayant une taille supérieure ou égale à 30 kb, nommées prophages par la suite. Ils sont susceptibles d'être actifs, c'est-à-dire capables de diriger leur excision et la formation de particules infectieuses. Dans un second temps, les séquences plus courtes et montrant une possible origine virale ont également été inventoriées (I. 7, ce chapitre).

L'analyse du panel de 50 génomes a permis de détecter des prophages présentant une organisation modulaire compatible avec celle décrite chez les bactériophages (Botstein, 1980; Ptashne, 1992; Lucchini *et al.*, 1999a) (**Fig. 18**). Au sein de ces génomes, l'ordre des modules est conservé, à savoir intégration-réplication-empaquetage-morphogénèse suivi du module de lyse (**Fig. 18**). Plusieurs génomes contiennent un module de composition variable en aval du gène de l'endolysine, nommé module distal. L'organisation des prophages et leur comparaison seront détaillées dans le Chapitre II. La **figure 17** présente l'ensemble des

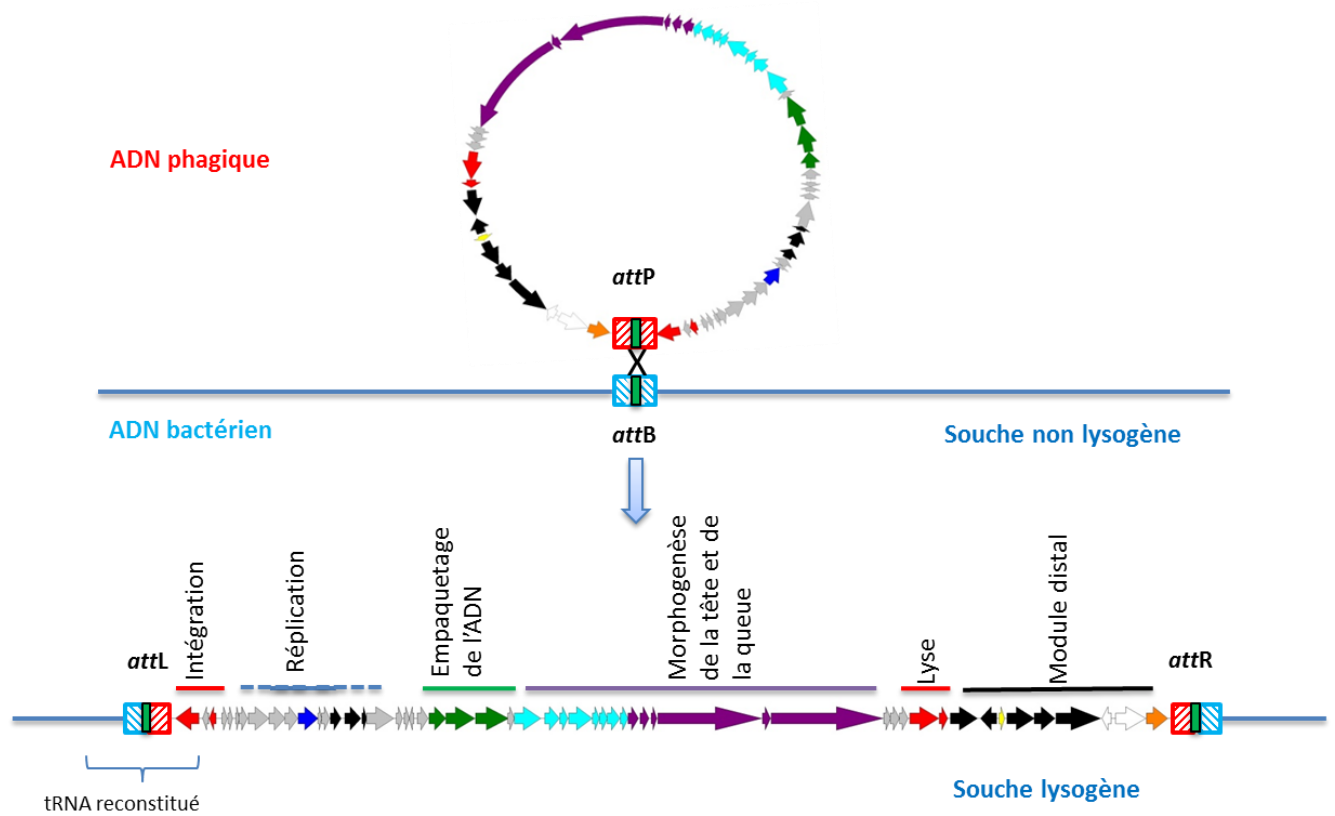


Figure 18. Organisation modulaire type des prophages identifiés chez *O. oeni*.

prophages identifiés. Les résultats montrent qu'ils sont largement distribués dans le panel analysé, et un total de 29 souches en abritent au moins un (58 %) (**Fig. 17**). Parmi les souches non lysogènes, on trouve PSU-1 et ATCC BAA-1163, dont les génomes ont été les premiers décryptés dans l'espèce. L'analyse permet de détecter un ensemble de 36 génomes viraux, dont les tailles varient de 31,3 kb à 46 kb.

### 3. Identification des sites d'intégration utilisés par les prophages

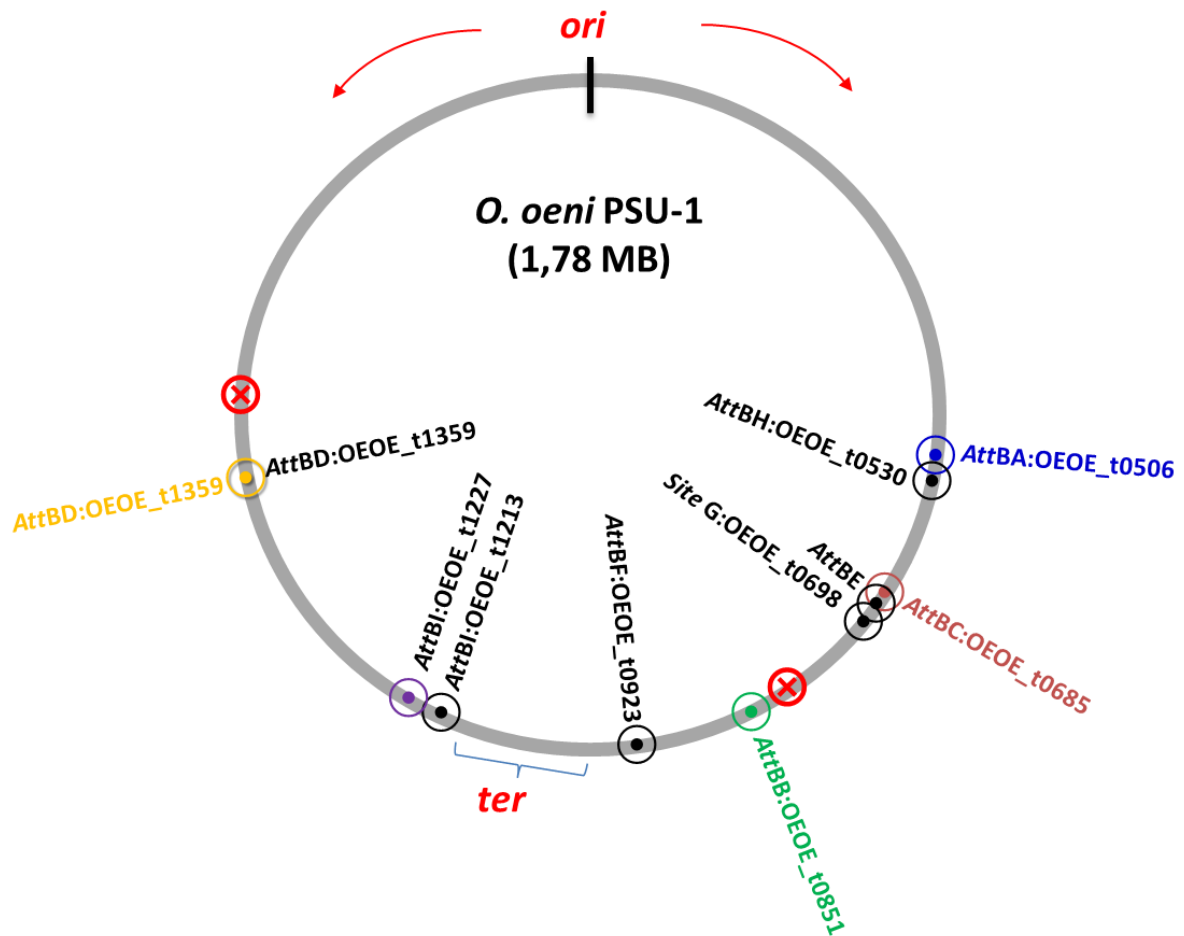
#### 3.1. Méthodologie

Les sites d'intégration utilisés par chacun des 36 prophages ont été recherchés manuellement à partir des génomes bactériens des souches lysogènes correspondantes. Les séquences relatives aux extrémités des prophages ont été comparées avec les séquences des génomes des souches non lysogènes. La mise en évidence d'une homologie entre, d'une part, les jonctions *attL* et *attR* présentes chez les lysogènes, et le site bactérien *attB* vide présent dans les souches non lysogènes d'autre part, permet de repérer le site cœur utilisé par le prophage pour s'intégrer *via* un mécanisme de recombinaison site-spécifique (RSS) dans le chromosome bactérien. Parmi les souches non lysogènes utilisées, PSU-1 a été utilisée en priorité dans nos comparaisons. En effet des expériences de lysogénisation de PSU-1 par différents phages tempérés ont mené à l'identification de différents sites d'intégration (Santos *et al.*, 1996; São-José *et al.*, 2004). Par ailleurs, les travaux de séquençage de PSU-1 par Mills *et al.* (2005) ont permis de générer une séquence unique circulaire, considérée comme le génome de référence de *O. oeni* et permettant de situer les différents sites *attB* les uns par rapport aux autres (**Fig. 19**).

#### 3.2. Les prophages sont intégrés dans quatre sites distincts

Les données *in-silico* montrent que 33 des 36 prophages identifiés sont intégrés dans le chromosome de *O. oeni*, et qu'ils se distribuent exclusivement dans quatre sites distincts





**Figure 19. Sites *attB* potentiels utilisés par les prophages et différents îlots chez l'espèce *O. oeni*.** Chaque site est nommé de A à I. Le génome de la souche PSU-1 est utilisé comme référence et les numéros de gènes correspondants sont utilisés. Les quatre sites utilisés par les prophages complets sont en couleur: bleu, type A; vert, type B; bordeaux, type C et jaune, type D. Les sites présentant des îlots sont représentés en noir. Les signes ⊗ représentent les deux opérons rRNA identifiés chez PSU-1.

(nommés *attB<sub>A</sub>* à *attB<sub>D</sub>*). Les sites correspondent tous à un gène *tRNA* et l'intégration a lieu dans son extrémité 3'. La séquence du gène *tRNA* est reconstituée dans le site d'attachement gauche, ou *attL* (**Fig. 18**). Les séquences *tRNA* sont une cible d'intégration fréquente pour les bactériophages, et il a été proposé que les intégrases ciblent ces séquences palindromiques conservées dans les génomes (Williams, 2002). Chez *E. coli* et *S. enterica*, les séquences *tRNA* ciblées par les prophages sont présentes à une seule copie dans les génomes. Le « choix » de ces séquences semble lié à leur faible expression, leur conservation au sein du génome cœur au cours de l'évolution, ainsi que leurs positions uniques sur le génome (Bobay *et al.*, 2013).

Chez *O. oeni*, les deux sites fréquemment occupés par un prophage sont les sites *attB<sub>A</sub>* (16 prophages) et *attB<sub>D</sub>* (9 prophages). Ils correspondent à des gènes codant des *tRNA<sup>Glu</sup>* et *tRNA<sup>Leu</sup>*, respectivement (OEOE\_t0506, Gene ID : 4416815 et OEOE\_t1359, Gene ID : 4415322 chez *O. oeni* PSU-1, respectivement) (**Fig. 19**). Les sites *attB<sub>B</sub>* et *attB<sub>C</sub>* sont occupés par trois et cinq prophages, respectivement. Ils correspondent à des gènes *tRNA<sup>Leu</sup>* (OEOE\_t0851, Gene ID: 4416110) et *tRNA<sup>Lys</sup>* (OEOE\_t685, Gene ID : 4416758).

Des travaux antérieurs de caractérisation des modalités de RSS d'oenophages ont montré que les sites *attB<sub>A</sub>*, *attB<sub>B</sub>* et *attB<sub>C</sub>* étaient utilisés par les oenophages tempérés fOg44/30,  $\phi$ 10MC et fOgPSU-1, respectivement (Gindreau *et al.*, 1997; São-José *et al.*, 2004). Les fréquences élevées d'occupation des trois sites observées dans ce travail confortent donc l'idée qu'ils sont majoritairement utilisés par les oenophages. D'autre part, l'originalité de cette première analyse des génomes réside dans l'identification d'un quatrième site dans le génome correspondant au site *attB<sub>D</sub>*.

### 3.3. De rares cas de poly-lysogénie et d'intégration en tandem

Sept souches contiennent deux prophages distincts, et trois cas de figure sont trouvés. Ces souches particulières ont été lysogénisées aux sites *attB<sub>A</sub>* et *attB<sub>D</sub>* (AWRIB429, AWRIB568 et AWRIB576), aux sites *attB<sub>A</sub>* et *attB<sub>C</sub>* (AWRIB304, S28, IOEB CiNe) et enfin aux sites *attB<sub>B</sub>* et *attB<sub>C</sub>* (AWRIB202). La poly-lysogénie est donc peu courante chez *O. oeni*, et le nombre de prophages par génome est peu élevé par rapport à des espèces comme *E.*



*faecalis* dont les souches peuvent contenir jusqu'à cinq prophages (Yasmin *et al.*, 2010). Chez *Lb. plantarum*, la souche WFSC1 contient quatre prophages distincts (Ventura *et al.*, 2003). Ce nombre est supérieur chez *E. coli* (2 à 20) ou bien *Salmonella* (1 à 8) (Bobay *et al.*, 2013).

L'analyse des données de séquençage obtenues par l'AWRI a mené à l'identification de cas d'intégration d'un même prophage en tandem. Cette situation est trouvée aux sites *attB<sub>A</sub>* et *attB<sub>C</sub>* chez les souches AWRIB548 et AWRIB304, respectivement (Borneman *et al.*, 2012), et est basée sur la seule analyse *in-silico*. L'hypothèse n'a pas été vérifiée expérimentalement grâce à des expériences d'électrophorèse en champs pulsés, suivies d'hybridations avec l'ADN viral. Les données obtenues lors des deux campagnes de séquençage réalisées par notre équipe ne permettent pas d'évoquer cette possibilité pour les souches que nous avons isolées. Cette différence peut être liée à des modalités d'isolement différentes, car l'intégration en tandem est souvent instable. De manière alternative, un biais serait possible dans l'analyse réalisée par Borneman *et al.* (2012), et lié à la présence concomitante de prophages intégrés et libres sous forme circulaire, interprétée comme la présence d'une intégration en tandem.

### 3.4. Localisation des quatre sites d'attachement majeurs sur le chromosome

**Le site *attB<sub>A</sub>*** se trouve en aval d'une séquence *tmRNA*, qui est souvent un « hotspot » pour l'intégration d'éléments génétiques mobiles (Julio *et al.*, 2000; Williams, 2002; Bobay *et al.*, 2013) (**Fig. 20**). Le gène code une molécule stable d'ARN ayant les propriétés à la fois d'un ARN transfert et d'un ARN messager. Il joue des rôles multiples dans la cellule, dans le contrôle de qualité des protéines intracellulaires (il libère les ribosomes des protéines dont la synthèse est ralentie ou arrêtée), ou encore dans la modulation de la fixation des protéines à l'ADN (Karzai *et al.*, 2000).

**Le site *attB<sub>B</sub>*** est localisé à proximité d'un gène codant un canal mécano-sensible de large conductance (MscL), dont un homologue existe chez de nombreuses BL (Le Marrec, 2011) (**Fig. 20**). Chez *Lc. lactis*, cette protéine membranaire intégrale correspond au canal



principal permettant l'efflux de glycine bêtaïne afin d'éviter l'éclatement des cellules, et permet ainsi à la bactérie de survivre lors de chocs hypo-osmotiques (Debret, 2007). Selon les auteurs, un mutant  $\Delta mscL$  perd 60 % de son activité fermentaire sur glucose, et ceci est corrélé à la perte en viabilité cellulaire (Folgering *et al.*, 2005).

Contrairement aux sites *attB<sub>A</sub>* et *attB<sub>B</sub>*, les régions bordant **les sites *attB<sub>C</sub>* et *attB<sub>D</sub>*** montrent une certaine plasticité selon les souches analysées (**Fig. 20**). En effet ces deux régions contiennent des îlots, dont l'analyse sera détaillée en fin de chapitre.

**Le site *attB<sub>C</sub>*** est situé entre deux cadres de lecture codant une protéine hypothétique, et la protéine CcpA (Catabolite control protein), un régulateur du métabolisme du carbone chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> (Swint-Kruse & Matthews, 2009). La protéine CcpA est présente chez plusieurs bactéries à Gram<sup>+</sup> épiphytes, dont différentes espèces de BL (*Lb plantarum*, *P. pentosaceus* ...) (Siezen *et al.*, 2006). Le régulateur jouerait un rôle dans la dégradation et l'utilisation d'oligo- et de poly-saccharides végétaux.

Enfin, le **site *attB<sub>D</sub>*** est localisé entre deux gènes codant une protéine ribosomale (ribSU) et une NADH quinone réductase nommée Qor (**Fig. 20**). Chez *Helicobacter pylori*, l'enzyme joue un rôle important dans la réponse à différents stress oxydatifs (Wang & Maier, 2004).

L'inventaire réalisé chez *E. coli* et *S. enterica* par Bobay *et al.* (2013) évoque la possibilité que les prophages évitent les sites *tRNA* les plus fortement exprimés par l'hôte, ainsi que les régions chromosomiques contenant la plus grande fraction de gènes fortement exprimés. La transcription à partir des gènes bactériens voisins pourrait nuire à la stabilité du prophage. Les prophages évitent également chez *E. coli* les sites contenant des motifs particuliers (MatS/Kops) qui régulent les processus cellulaires affectant le chromosome, comme la formation de macro-domaines ou la ségrégation. Les mêmes auteurs suggèrent également que le site est plus qu'un lieu physique d'intégration, et que son choix pourrait conférer d'autres fonctions aux prophages comme la régulation de l'expression génique. Ainsi l'expression du *tmRNA* chez *Salmonella enterica* est importante pour l'expression du phage P22-like, et des îlots de pathogénicité intégrés à proximité immédiate (Julio *et al.*, 2000). Chez *O. oeni*, il est intéressant de noter que les phages s'insèrent à proximité



immédiate de gènes codant des fonctions essentielles pour la cellule (*ccpA*, *mscL*, notamment).

La localisation des quatre sites utilisés est représentée sur le chromosome de la souche PSU-1 (**Fig. 19 & 20**). L'origine de la réplication du génome de PSU-1 a été identifiée comme étant adjacente au gène *dnaA* et correspond classiquement à la position 0 utilisée pour la numérotation des gènes. Les sites *ter* associés au site *dif* seraient localisés aux environs de la position 1000 kb, en une position diamétralement opposée à l'*ori* (Mills *et al.*, 2005). L'axe passant de l'origine à la terminaison de la réplication sépare le chromosome en deux parties nommées "réplicore gauche" et "réplicore droit". Les sites *attB<sub>A</sub>*, *attB<sub>B</sub>* et *attB<sub>C</sub>* sont localisés dans une même région chromosomique de 300 kb au sein du réplicore droit (entre les positions 490 à 798 kb). Le site *attB<sub>D</sub>* est plus distant et se retrouve dans le réplicore gauche, à 1,26 Mb de l'*ori*.

Il existe une orientation prédominante des gènes des prophages par rapport à la direction de la fourche de réplication (gènes correspondant aux modules de réplication-empaquetage-morphogénèse et de lyse). Une telle orientation serait adoptée chez les prophages pour limiter les collisions entre l'ARN polymérase et la fourche de réplication (Campbell, 2002; Rocha & Danchin, 2003). C'est le cas pour de nombreux prophages lambdaïdes d'*Escherichia* et *Salmonella* ou encore pour les prophages de *S. pyogenes* (Nakagawa *et al.*, 2003; Bobay *et al.*, 2013). Selon Bobay *et al.* (2013), 85 % des prophages ont cette organisation caractéristique de co-orientation des gènes avec la fourche de réplication chez *E. coli*. Pourtant, les auteurs ont noté que la majorité des gènes codant les répresseurs phagiques, qui sont exprimés par les prophages, sont en sens opposé. Il y aurait donc d'autres explications à la polarisation des prophages dans les génomes, comme par exemple une association entre les mécanismes d'intégration du génome viral et la fourche de réplication.

### 3.5. Taille des sites d'attachement requis pour la RSS

Les séquences bordant les prophages aux sites *attB<sub>A</sub>*, *attB<sub>B</sub>* et *attB<sub>C</sub>* ont été comparées avec les séquences des gènes *tRNA* « vides » présents chez les souches non lysogènes. Les



## A) OEOE\_t1359 (PSU-1)

5' GCGGACGTGGCGGAATTGGCAGACGCGCAGGATTAAGGATCCTG  
 TGGTAGAAATACCGTATGGGTTGACTCCCATCGCCCCGCA 3'

## B)

	10	20	30	40	50	60
IOEB8417_attL	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGATTGATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGCTTA
S11_attL	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGATTGATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGCTTA
S13_attL	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGATTGATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGCTTA
IOEB8417_attR	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTGTCGCTTA
S11_attR	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTT--GCTTA
S13_attR	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGATTGATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGATTA
IOEB0501_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGATTGATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGATTA
PSU-1_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTT--GCTTA
IOEB0205_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTT--GCTTA
IOEB0607_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTTTGCTTA
IOEB0608_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTT--GCTTA
IOEB9304_attB	CATCGCCCCG	ATTTTAGCTC	TATATCGACA	AAGGT-GATA	TAGAGCTTTT	TTGTTGCTTA
	*****	*****	*****	*** *	*****	** *****
				1 2		3,4,5
	70	80	90	100	110	120
IOEB8417_attL	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATCCTC
S11_attL	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATCCTC
S13_attL	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATCCTC
IOEB8417_attR	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
S11_attR	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
S13_attR	AATGCCTTGA	TATTATGTTT	TCTAGATTTT	TTTAAGTTAA	TTTCTTAGGC	TCTAATATAA
IOEB0501_attB	AATGCCTTGA	TATTATGTTT	TCTAGATTTT	TTTAAGTTAA	TTTCTTAGGC	TCTAATATAA
PSU-1_attB	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
IOEB0205_attB	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
IOEB0607_attB	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
IOEB0608_attB	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TATTATTTTC
IOEB9304_attB	AATGCCTTTG	TATAGGTATT	TGTAGCTATG	ATTAATGATC	GCTAAATCTTT	TTTTATTTTC
	*****	*** ** *	*****	*** *****	*****	***** **
		6 7		8		9
	130	140				
IOEB8417_attL	TATAAAAAC	TTGCACACTT	TG			
S11_attL	TATAAAAAC	TTGCACACTT	TG			
S13_attL	TATAAAAAC	TTGCACACTT	TG			
IOEB8417_attR	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
S11_attR	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
S13_attR	<i>CGTCTGCCTA</i>	<i>TTTTAGTTCG</i>	CA			
IOEB0501_attB	<i>CGTCTGCCTA</i>	<i>TTTTAGTTCG</i>	CA			
PSU-1_attB	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
IOEB0205_attB	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
IOEB0607_attB	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
IOEB0608_attB	TATAAAAAC	TTAAAACACTT	TG			
IOEB9304_attB	TATAAAAAC	TTGTTTATTC	AC			
	*****	** * ****	**			
				10/11, 12		

**Figure 21. Comparaison entre les séquences des sites attR, attL et attB impliqués dans la RSS des prophages de type D chez *O. oeni*.** A) Séquence du gène *tRNA<sup>Leu</sup>*. L'anticodon est souligné et les 11 pb associées aux différents sites att sont en rose B) Les sites d'attachement (attL et attR) sont retrouvés chez les souches lysogènes et les sites d'attachement bactérien (attB) sont obtenus à partir de souches non lysogènes. Les mutations ponctuelles sont numérotées de 1 à 12 et surlignées en gris. Les demi-sites non-homologues des séquences attR et attB présents chez les souches S13 et IOEB 0501 respectivement, sont indiqués en gras et en italique.

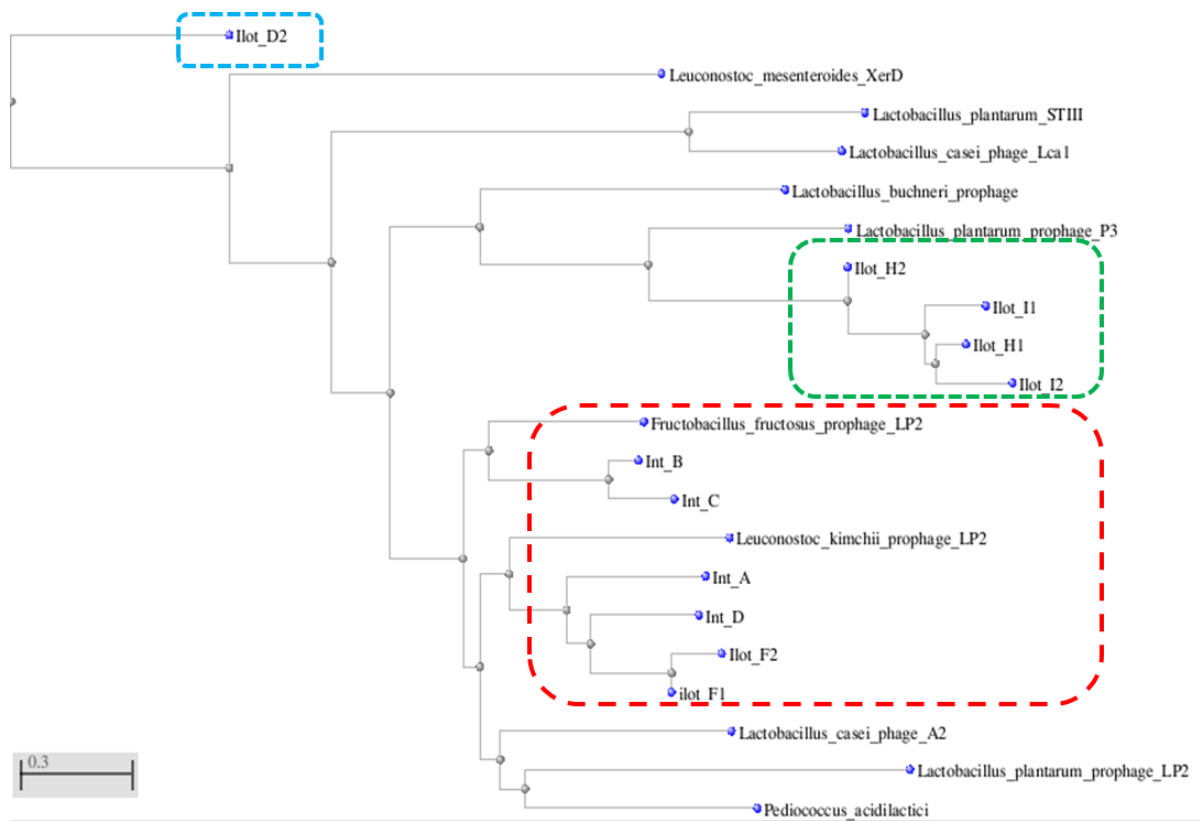
homologies existant entre les sites *attL*, *attR* et *attB* permettent de proposer des tailles de 17 pb, 15 pb et 20 pb pour les sites A, B et C. Ces données sont en accord avec les données de Gindreau *et al.* (1997) et Sao-José *et al.* (2004).

Le site *attB<sub>D</sub>* se distingue des trois autres par sa taille. Les sites d'attachement présents chez neuf souches lysogènes de prophages de type D ont été comparés aux sites *attB* identifiés chez les souches non lysogènes. L'analyse montre que l'homologie requise pour la RSS à ce site est de 140 pb. Au niveau du site *attL*, la séquence contient 11 pb correspondant à l'extrémité 3' du gène *tRNA* (Fig. 21 A). L'intégrité du gène *tRNA<sup>Leu</sup>* est reconstituée au niveau du site *attL* après recombinaison (Fig. 18 & 21 A). Les séquences de 140 pb des trois sites *attR*, *attL* et *attB* montrent des mutations ponctuelles selon les souches, dont l'impact n'est pas connu (Fig. 21 B). La taille élevée du site est surprenante et est rare chez les bactéries lactiques, et les bactéries en général. Néanmoins, il ne s'agit pas d'un cas unique. L'homologie requise pour la recombinaison du phage HP1c1 chez *Haemophilus influenzae* est ainsi de 183 pb (Waldman *et al.*, 1987). Des tailles plus courtes (quelques pb) ont été rapportées et sont associées à des phages dont la RSS est assurée par des recombinases à sérine, comme  $\phi$ C31 de *S. coelicolor* (Rausch & Lehmann, 1991) et  $\phi$ AAU2 d'*Arthrobacter aurescens* (Le Marrec, communication personnelle).

L'analyse réalisée a permis la définition de couples d'amorces spécifiques des quatre sites utilisés par les prophages de *O. oeni*. Leur utilisation conduit à l'amplification de fragments de 145 pb (*attB<sub>A</sub>*), 730 pb (*attB<sub>B</sub>*), 337 pb (*attB<sub>C</sub>*), et 342 pb (*attB<sub>D</sub>*).

#### 4. Corrélation entre type d'intégrase et site *attB* utilisé pour la recombinaison site-spécifique

Les intégrases des prophages de *O. oeni* sont des recombinases à tyrosine, ce qui est le cas pour les phages décrits chez les BL. Les gènes *int* sont localisés à proximité du site *attL* et leur orientation transcriptionnelle (dans la direction *attL/attP*) est conservée chez tous les prophages analysés (Fig. 18). Les comparaisons des séquences protéiques ont révélé



**Figure 22. Phénogramme des intégrases des prophages complets et des îlots identifiés chez *O. oeni* et de phages infectant d'autres bactéries lactiques.** L'arbre est obtenu par la méthode "neighbor-joining" en utilisant le programme COBALT (Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool, max seq difference, 0,95).

l'existence de quatre groupes d'homologie, répartis en deux clusters (**Fig. 22**). L'appartenance à un groupe donné est corrélée à l'utilisation d'un site d'attachement particulier. Les quatre intégrases ont donc été nommées A à D par la suite du travail.

L'analyse de la phylogénie des intégrases des prophages de *O. oeni* (**Fig. 22**) montre que les intégrases de type A et D sont associées dans un même cluster, et sont homologues à des intégrases de phages infectant les espèces *Leuconostoc kimchii* (Lee *et al.*, 2011) et *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Le second cluster identifié correspond aux intégrases de type B et C. Les protéines homologues identifiées en Blastp correspondent également à des intégrases virales, dont l'une est associée à une souche de l'espèce *Fructobacillus fructosus*. Les quatre espèces du genre *Leuconostoc* (*L. durionis*, *L. ficulneum*, *L. fructosum* et *L. pseudoficulneum*) ont été reclassées dans le nouveau genre *Fructobacillus* (Endo & Okada, 2008). Des homologies sont également trouvées avec les intégrases des phages Shal et LF1 infectant *Lb. plantarum* et *Lb. fermentum*, respectivement.

Ces analyses permettent de proposer une première classification des prophages dans l'espèce *O. oeni*. Nos données permettent également d'envisager la mise au point d'un premier outil rapide de détection (voire de quantification) des oenophages. En effet, dans chacun des groupes (A à D), les séquences nucléotidiques des gènes *int* partagent une forte identité (97-100 %). Nous avons donc défini un couple d'amorces spécifiques de chaque type de séquence *int*. Les amorces sont localisées dans l'extrémité 5' des gènes, et elles permettent d'amplifier des séquences de 273 pb (*int<sub>A</sub>*), 443 pb (*int<sub>B</sub>*), 425 pb (*int<sub>C</sub>*) et 343 pb (*int<sub>D</sub>*).

Nous avons ensuite vérifié la pertinence de cet outil non plus sur des prophages détectés *in-silico*, mais sur des phages libres, c'est-à-dire dont l'aptitude à mener un cycle lytique a été démontrée. En premier lieu, les trois phages tempérés fOg44, fOgPSU-1 et  $\phi$ 10MC isolés dans des études précédentes (Santos *et al.*, 1996; Gindreau *et al.*, 1997) ont été analysés. Les lysats n'étaient pas/plus disponibles au laboratoire. Cependant, l'étude de ces phages avait mené au séquençage de leur module d'intégration ainsi que du site d'intégration utilisé chez la souche PSU-1. Ces données ont donc été extraites des banques de données. L'analyse de ces trois phages de type A, B et C a confirmé la corrélation établie entre le site *attB* utilisé et la séquence de leur intégrase.

**Tableau VIII. Morphotypes des phages isolés à partir de vin de Pauillac (campagne 2011).**

Souches \ Phages	S28	S51	S11	S15	S161	IOEB S277	IOEB S450
φ 19-277				c ++	c +	c +++	t ++
φ 29-S161					t +	t ++	
φ 34-S161		t ++			c +++	c +++	
φ36-450						t +	t ++
φ29- S28	c ++			t ++		t +	
φ34- S28	c ++			c ++		t +	c +++
φ36- S28	c +			c+		t ++	
φ37- S28	c ++					c +	t ++
φ39- S28	c ++					c ++	
φ31-S51		t +	c +++			c +	
φ32- S51		t +	c ++			c ++	
φ34- S51		c ++				c ++	
φ35- S51		c ++				c ++	
φ36- S51		t ++				c/t ++	t +
φ37- S51		t +	t ++			c ++	t +
φ25b-S15	c +			t ++	c/t ++	t ++	

Les couples phage/hôte sont représentés par la même couleur. L'aspect des plages est indiqué par les lettres : c (clair), t (trouble) ou c/t (clair et trouble).

En 2011, une campagne d'isolement de bactériophages a été menée à partir de vins. Il s'agissait de vérifier que les phages isolés contenaient bien une séquence *int* appartenant à l'un des quatre groupes identifiés. Nous avons privilégié des vins de la région de Pauillac, collectés en cours, ou en fin de fermentation alcoolique. Afin de pallier une éventuelle faible concentration en virus dans les vins, nous avons opté pour une étape préliminaire d'amplification dans un milieu de laboratoire (MRS $\phi$ ) pendant cinq jours. Il était attendu que la population virale augmente suite à l'infection des bactéries présentes dans l'échantillon, et/ou après induction à partir de souches lysogènes. La recherche de bactériophages a été réalisée par la technique de la double-couche, en testant sept souches indicatrices différentes. Nous avons utilisé des souches isolées par la société Laffort, car ces levains sont largement utilisés dans la région bordelaise. Des plages de lyse ont été observées pour 19 des 22 échantillons, montrant que les oenophages sont fréquemment présents dans les vins. Nous avons retenu pour la suite de l'étude un panel de 17 plages de lyse, se distinguant par (i) leur morphologie et (ii) la souche hôte sur laquelle elles ont été observées (**Tab. VIII**). Un lysat concentré a été préparé à partir de chaque plage sur la souche hôte initiale: S15 (1 phage), S28 (5), S51 (7), IOEB S277 (1), IOEB S450(1) et S161 (2). Tous les lysats ont ensuite été propagés sur la souche non lysogène IOEB S277 (qui s'est révélée sensible pour tous les phages isolés) et des plages ont subi deux purifications successives. Il s'agissait d'obtenir des lysats purs, car il a été établi que les souches S28, S51, IOEB S450 et S161 contiennent un prophage résident.

Le typage des phages a été réalisé par PCR. Nous avons mis au point une approche d'amplification directe sur particules (> 20 UFP/essai). Chaque échantillon a été soumis aux quatre réactions ciblant les gènes *int* A à D. Tous les phages isolés ont répondu positivement à l'une des réactions PCR (**Tab. IX**). Les quatre séquences d'intégrase représentent la diversité des oenophages. Nous disposons donc bien **d'un premier outil de détection des phages** infectant *O. oeni*.

Il est important de préciser que notre protocole d'isolement de phages comporte un certain nombre de biais, liés notamment à la multiplication des phages en bouillon MRS, ou encore au choix arbitraire des morphotypes de plages considérés comme différents, et sélectionnés pour le typage moléculaire. La répartition des phages observée est donc susceptible d'être différente de celle réellement trouvée dans les vins. Ces réserves étant

**Tableau IX. Typage par PCR des intégrases d'oénophages isolés du vin lors de la campagne 2011.**

Type intégrase	Phages actifs isolés du vin
Int A	2 (11,75%)
Int B	7 (41,2%)
Int C	1 (5,85%)*
Int D	7 (41,2%)

\*Le lysat contenant le phage C n'est pas pur.

émises, on note que les phages de type B et D étaient les plus fréquents (~ 41,2 %) suivis par les phages A (~ 12 %). Un seul lysat phagique a montré la présence d'un signal *int<sub>C</sub>*. Cependant, il contenait également une séquence *int<sub>B</sub>*, indiquant qu'il n'était pas pur. Des essais ultérieurs de purification des deux phages à partir des plages isolées n'ont pas permis d'isoler le phage de type C. Ces résultats suggèrent que ce phage à intégrase de type C isolé du vin ne serait pas capable de se propager seul.

Enfin, nous avons effectué une dernière vérification de la **corrélation établie entre les séquences *int* et le site *attB* utilisé pour la RSS**. La concentration des lysats de trois phages isolés du vin,  $\phi$ 36-S28 (type A),  $\phi$ 25b-S15 (type B) et  $\phi$ 29-S28 (type D) a été déterminée par la technique de la double-couche sur la souche sensible IOEB S277. Des plages troubles ont été repérées, et le contenu a été isolé sur gélose MRS. Après trois repiquages, la nature lysogène des souches isolées a été vérifiée par PCR en recherchant la présence de la séquence *int* ainsi que de la jonction *attL* (A, B ou D). L'amplification de chaque type de jonction *attL* a été réalisée en associant deux amorces, issues pour l'une du couple *int*, et pour l'autre du couple *attB*. Nous avons ainsi pu montrer que les phages A, B et D s'étaient bien intégrés au niveau des sites *attB* attendus dans le chromosome de la souche PSU-1.

## 5. Des prophages en cours de curage ?

Les séquences correspondant à trois prophages associés aux souches IOEB C28 et S19 ont retenu notre attention. L'absence des séquences *attL* et *attR* dans les données de séquençage peut suggérer un état de pseudo-lysogénie chez les souches. Cet état a été évoqué chez *O. oeni* par Arendt *et al.* (1990). Ces auteurs avaient observé le curage des phages par simple ré-isolément des souches porteuses. L'absence de séquences *attL* et *attR* dans les génomes peut toutefois être un artéfact de séquençage lié au nettoyage des séquences. La vérification *in-vivo* a donc été réalisée à partir des souches IOEB C28 et S19. Les prophages dont le statut d'intégration n'est pas défini sont au nombre de trois, et sont de type A et C chez S19, et de type D chez S28. Une stratégie PCR a donc été mise en place





afin (i) d'amplifier l'intégrase ainsi que le site *attL*, et (ii) de vérifier l'absence d'amplification du site *attB* (*attB* dit vide).

**Chez la souche IOEB C28**, l'analyse *in-silico* à l'aide du logiciel PHAST a montré la présence de deux séquences incomplètes de 10,6 kb et de 31,3 kb, et de nombreux petits contigs (> 10 contigs de taille allant de 1,1 à 5,6 kb). La reconstruction manuelle fastidieuse d'un prophage de type D a été réalisée, mais n'a pas permis toutefois de livrer un prophage complet. Cette séquence contenait une séquence *int* partielle de 731 pb. La taille du gène *int* associé aux prophages de type D est de 1044 pb, et le gène *int* du prophage de C28 est tronqué dans son extrémité 3'. Nous avons vérifié la présence des régions correspondant aux deux amorces *int<sub>D</sub>* sur la séquence reconstituée. Cependant aucune amplification de la séquence *int<sub>D</sub>* n'a été observée à partir de l'ADN de la souche. Il en a été de même pour les jonctions gauche et droite tandis que l'amplification du site *attB* de la souche a été obtenue, montrant qu'il est inoccupé. Nos résultats suggèrent donc l'existence d'un prophage de type D, probablement défectif au niveau du gène de l'intégrase, et existant sous une forme libre dans le cytoplasme de la souche IOEB C28. Notre incapacité à détecter sa présence par PCR pourrait suggérer que son ADN est présent de façon minoritaire au sein de la population de cellules utilisée lors de l'extraction d'ADN génomique et peut être perdu lors de repiquages.

**L'analyse par PHAST des données de la souche S19** indique la présence d'une première région prophagique *à priori* complète de type C, et dont la taille est de 34,8 kb. Le prophage est assemblé en un seul contig. La proximité des gènes codant l'intégrase et l'endolysine suggère que le prophage détecté est sous une forme circulaire extra-chromosomique. Deux régions supplémentaires ont également été identifiées. Une reconstruction manuelle à partir des données de PHAST a permis d'assembler une région de 20,4 kb (contenant les modules empaquetage-morphogénèse-lyse-distal) avec un fragment de 11,7 kb (contenant les modules : lysogénie-réplication) en un unique prophage de type A.

L'examen de l'ADN de la souche S19 par PCR a montré l'amplification des sites *attB<sub>A</sub>* et *attB<sub>C</sub>*, démontrant ainsi que les deux prophages détectés ne sont pas intégrés dans le génome. Malgré la présence des séquences dans les données génomiques, aucune amplification des séquences *int<sub>A</sub>* et *int<sub>C</sub>* n'a été obtenue par ailleurs. Ces résultats suggèrent à nouveau une présence hétérogène des séquences au sein de la population de cellules.

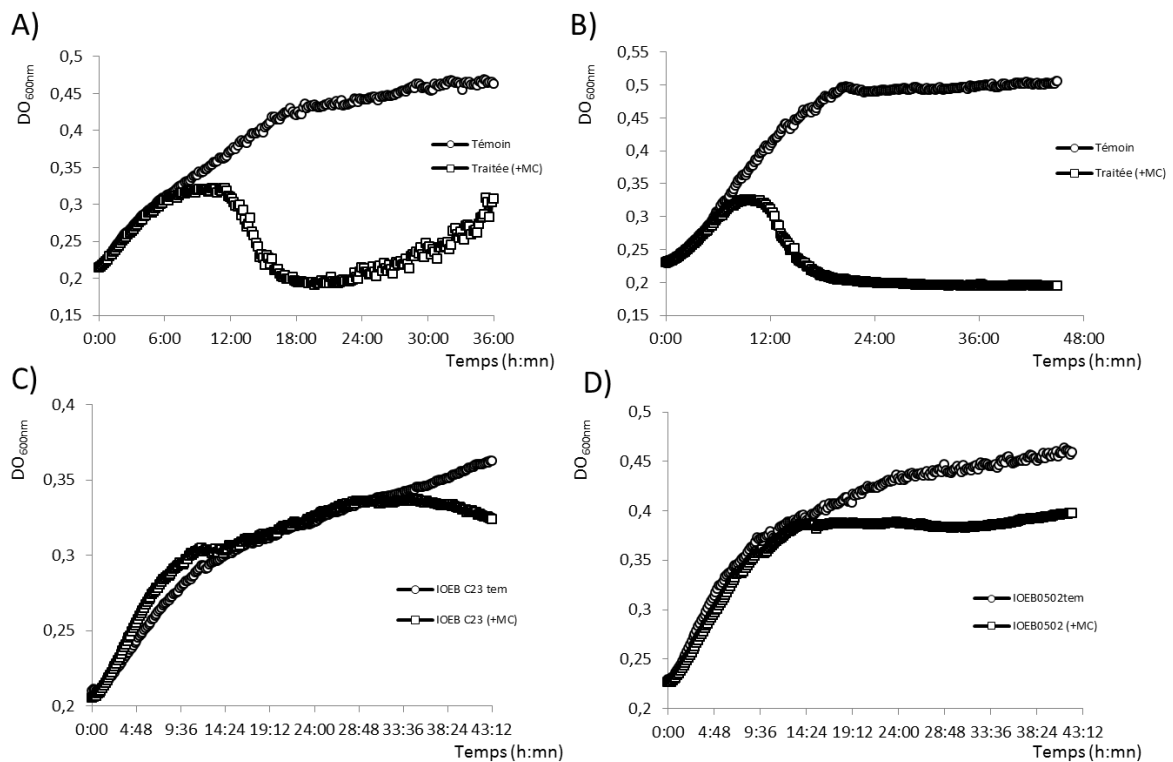


Enfin, il est intéressant de noter que l'analyse *in-silico* des données relatives à la souche IOEB CiNe suggère la présence d'un seul prophage intégré dans le site *attB<sub>C</sub>*. Sa présence a été vérifiée expérimentalement. Cependant l'analyse a également permis de détecter la présence d'un second prophage intégré au niveau du site *attB<sub>A</sub>*. Il est possible que la culture réalisée pour effectuer l'extraction de l'ADN destiné au séquençage ait subi la perte du prophage de type A.

Les cas rapportés pour les deux souches IOEB C28, S19 suggèrent que des oenophages peuvent adopter un statut de pseudo-lysogénie. Ceci conforte les observations antérieures (publiées, ou rencontrées expérimentalement au cours de la thèse avec la souche S11 par exemple) qu'un simple ré-isolement en conditions de laboratoire peut provoquer la perte du prophage. Mais le phénomène n'explique pas à lui seul l'échec observé dans la détection des séquences prophagiques par PCR. Une hypothèse serait que le prophage à l'état de pseudo-lysogénie, subisse un curage progressif et ne soit pas présent dans chaque cellule de la population analysée. Ce phénomène expliquerait la qualité moindre des séquences obtenues et les difficultés rencontrées lors des amplifications PCR. Une hypothèse différente peut également être avancée, dans laquelle les observations réalisées chez S19 et IOEB C23 ne relèveraient pas d'un état de pseudo-lysogénie, mais seraient la conséquence d'une infection virale précoce de la culture réalisée au laboratoire afin d'extraire l'ADN destiné au séquençage. Aucun test vérifiant la présence de plages dans les surnageants de culture n'a été réalisé lors du contrôle qualité précédant l'envoi au prestataire de séquençage. Cependant, dans le cas de la souche S19, l'attaque simultanée par deux phages distincts semble peu probable.

## 6. Fonctionnalité des prophages

Un ensemble de 33 prophages sont répartis au sein de quatre sites d'attachement et l'analyse *in-silico* prédit que leur organisation génétique est complète, et peut mener à l'établissement d'un cycle lytique. Cette partie a pour objectif d'évaluer leur capacité à s'exciser et à former des particules infectieuses sur un hôte sensible.



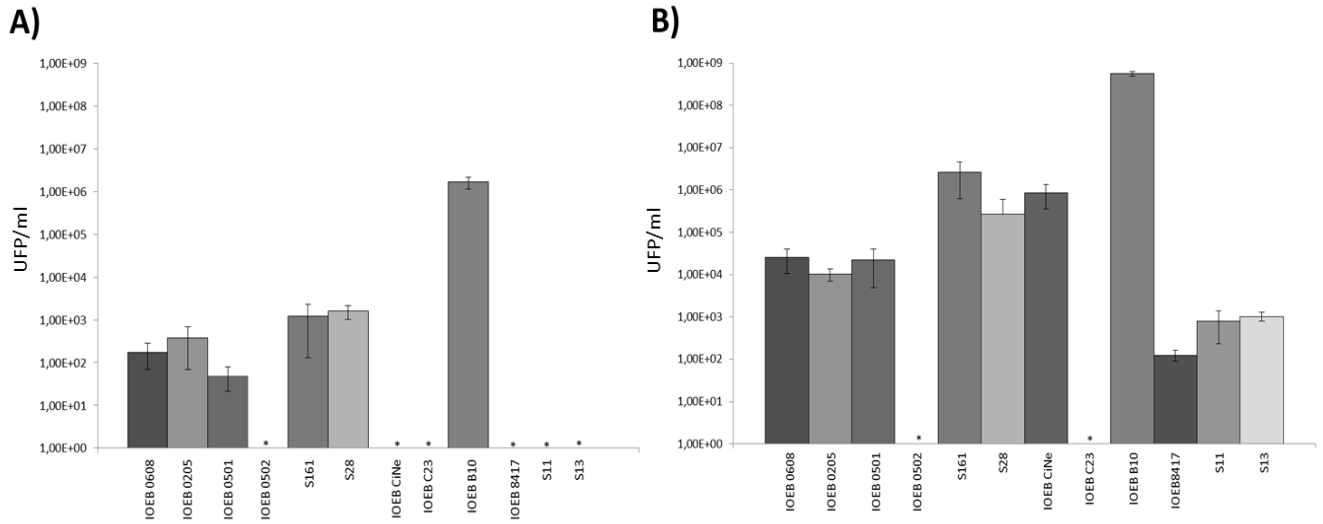
**Figure 23. Courbes de croissance des souches lysogènes après induction des prophages à la mitomycine C.** **A)** Courbes-types obtenues lors de l'induction des prophages de type D présents chez les souches IOEB 8417, S13 et S11 **B)** Courbes d'induction des prophages de type A (IOEB 0608, IOEB 0205, IOEB 0501, S161), du prophage de type B de la souche IOEB B10 et des souches double-lysogènes (A + C) S28 et IOEB CiNe; **C)** et **D)** Courbes caractéristiques des deux prophages non-inductibles chez la souche IOEB C23 (type B) et IOEB 0502 (type A) respectivement.

Plusieurs prophages abrités par des souches différentes ont montré un fort pourcentage d'homologie nucléotidique (> 90 %), et le choix d'une seule souche a alors été fait pour les tests d'induction. Ainsi, entre les trois souches IOEB 9805, IOEB 9803 et IOEB 8417, le choix s'est porté sur cette dernière. De même, entre la souche IOEB B16 et IOEB 0205, c'est IOEB 0205 a été retenue. La totalité des 50 souches n'étant pas disponible au laboratoire, nous avons induit un ensemble de 12 souches lysogènes. Parmi ces souches, cinq sont mono-lysogènes de type A, deux de type B, et enfin trois de type D. Deux sont double-lysogènes de type A + C.

La mitomycine C (MC) a montré par le passé une bonne capacité à induire les prophages de *O. oeni* (Huang *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1996; Poblet-Icart *et al.*, 1998). Au laboratoire, Gindreau (1998) avait montré l'induction de la souche B10 (qui abrite l'oénophage tempéré  $\phi$ 10MC) à la MC. Le protocole a donc été développé sur la souche IOEB B10, puis testé sur les 11 autres souches. L'initiation du cycle lytique après induction du prophage se traduit par une lyse, mesurable par suivi de la densité optique. Parallèlement, la production de particules virales actives dans le surnageant est vérifiée par la technique de la double-couche en utilisant la souche IOEB S277. La souche a été identifiée comme étant particulièrement sensible aux phages lors de notre première campagne d'isolement de bactériophages. Les résultats sont présentés sur les **figures 23 & 24**.

### 6.1. Souches lysogènes pour un prophage de type D

Les trois souches testées montrent un ralentissement de la croissance après 8 h de contact avec la MC puis une chute de la  $DO_{600nm}$  à partir de 11h (**Fig. 23 A**). Cette lyse est corrélée à l'apparition de phages actifs sur la souche IOEB S277. Sous l'action de la MC, la libération de particules virales chez les lysogènes du groupe D génère des concentrations qui varient de  $10^2$  à  $10^3$  UFP/ml (**Fig. 24**). Aucun virion n'est libéré spontanément, c'est-à-dire en l'absence de l'agent inducteur. La lysogénie établie par les phages de type D est donc particulièrement stable.



**Figure 24. Quantification des particules virales libérées dans le surnageant de culture en absence (A) ou en présence de mitomycine C (B).**

Les quantifications ont été réalisées par la technique de la double couche.

(\*) absence de libération de particules.

## 6.2. Souches de type A (IOEB 0608, IOEB 0205, IOEB 0501, S161) et souche IOEB B10 (type B)

Ces souches montrent une lyse légèrement plus rapide que les souches précédentes (**Fig. 23 B**). Chez les souches lysogènes de type A, l'induction spontanée libère de 30 à 500 UFP/ml pour les souches IOEB 0501, IOEB 0205 et IOEB 0608 (**Fig. 24**). Cette production est plus élevée chez les souches S161 (A) ( $\sim 10^3$  UFP/ml) et IOEB B10 (B) ( $\sim 10^6$  UFP/ml). L'ajout de MC dans le milieu induit une augmentation de la production virale de 2 unités  $\log_{10}$  pour les souches IOEB 0608 et IOEB 0205, et d'une unité supplémentaire pour les souches IOEB 0501, S161 et IOEB B10.

## 6.3. Souches IOEB C23 (type B) et IOEB 0502 (type A)

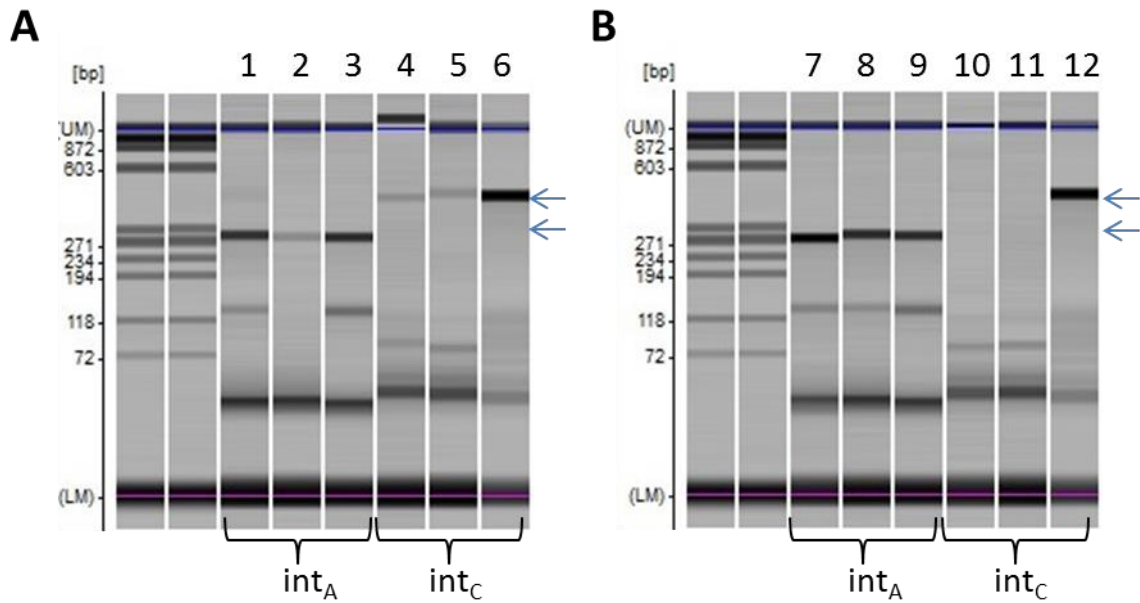
Aucune induction n'a été obtenue pour ces deux souches (**Fig. 23 C & D**). Dans les deux cas, la culture témoin et la culture traitée à la MC se sont développées normalement pendant les 14 heures suivant le traitement. Aucune plage de lyse n'a été mise en évidence lorsque les surnageants (témoin et traité) ont été mis au contact de la souche IOEB S277 (**Fig. 24**).

Martín *et al.* (2010) ont observé une lyse indiquant l'induction de particules à partir de souche lysogènes de *Lb. jensenii*, mais la fragilité des virions au niveau structural ne permettait pas la visualisation de plages de lyse. Dans notre cas, l'absence de lyse et de particules permet de statuer sur l'incapacité des prophages à générer des particules infectieuses alors qu'ils possèdent *à priori* tous les modules génétiques nécessaires pour initier un cycle lytique.

## 6.4. Souches lysogènes pour des phages de type C

Les souches lysogènes comportant un génome viral de type C intégré sont les souches S28 et IOEB CiNe. Elles sont toutes deux lysogènes pour un second prophage de type A.





**Figure 25. Typage des phages induits des souches double-lysogènes (type A et type C) S28 et IOEB CiNe.** Les surnageants d'induction ont été testés sur la souche sensible IOEB 277. Plusieurs plages ont été récupérées et soumises à des tests PCR. **A)** plages isolées répondant positivement à la présence de phage de type A et de type C: les pistes 1, 4 et 2, 5 sont des PCRs positives de plages isolées des surnageants de S28 et IOEB CiNe respectivement. Les pistes 3 et 6 sont des témoins positifs des amorces  $int_A$  et  $int_C$  respectivement. **B)** suspensions phagiques répondant uniquement au signal de l'intégrase de type A. les pistes 7, 10 et 8, 11 sont obtenues par amplification PCR à partir de plage de lyse des surnageants d'induction des souches S28 et IOEB CiNe respectivement. Les pistes 9 et 12 sont des témoins positifs des amorces  $int_A$  et  $int_C$  respectivement. La taille attendue pour chaque PCR est indiquée par une flèche.

**L'induction spontanée** des prophages diffère chez les deux souches. Ainsi, la culture de la souche S28 libère spontanément une concentration de  $10^3$  UFP/ml, alors que la souche IOEB CiNe semble maintenir avec succès sa lysogénie, puisqu'aucun phage n'est quantifié dans le surnageant de culture par la technique de la double-couche.

**Les courbes d'induction** en présence de MC montrent dans les deux cas, une quantité plus élevée en phages que dans le témoin non induit ( $10^5$ - $10^6$  UFP/ml). La concentration est proche de celles observées chez les souches mono-lysogènes de type A (**Fig. 23 B**). Nous avons tenté de mettre en évidence la présence des deux ADNs viraux (A & C) dans le lysat d'induction. Les deux lysats (S28 et IOEB CiNe) ont été positifs pour les deux séquences d'intégrase *int<sub>A</sub>* et *int<sub>C</sub>* alors qu'ils ne présentaient pas de signal Oo1-Oo2 (amorces spécifiques de l'ADN génomique de *O. oeni*). Ces résultats de PCR permettent de conclure que les ADNs des prophages A et C se sont bien excisés du génome bactérien en présence de MC chez les deux souches. Cependant, leur détection par PCR ne permet pas de savoir si l'ADN viral est libre, ou bien encapsidé.

Quelques plages individuelles obtenues à partir des surnageants d'induction de S28 et de IOEB CiNe sur la souche IOEB S277 ont été isolées. Le typage *int* des particules virales dans les plages par PCR est montré sur la **figure 25**. Deux types de réponses sont obtenues : quelques suspensions virales montrent un seul signal *int<sub>A</sub>+*, d'autres deux signaux *int<sub>A</sub>+* et *int<sub>C</sub>+*. Nous n'avons jamais observé un seul signal de type *int<sub>C</sub>+* (**Fig. 25**). Par ailleurs, une nouvelle propagation des lysats sur la souche IOEB S277 réduit la fréquence de détection de la séquence *int<sub>C</sub>+*.

Cette expérience suggère que les deux ADNs phagiques s'excisent en présence de MC. Contrairement aux phages de type A, la formation de particules virales infectieuses semble problématique pour le phage de type C. Une hypothèse est que l'ADN du prophage ne s'excise pas correctement, ou bien il s'excise correctement mais son génome ne peut ensuite initier un cycle lytique seul. Le lysat d'induction ne contiendrait donc pas de particules de phage C (sauf si son ADN est transduit dans une capsid du phage A).

Pour tester cette hypothèse, nous avons créé un dérivé de la souche IOEB S277 lysogène pour le prophage de type A abrité par la souche IOEB CiNe. Cette souche lysogène a été infectée à l'aide du lysat d'induction de la souche IOEB CiNe. Il est attendu que la



souche IOEB S277 lysogène bloquera le développement des phages A induits présents dans le surnageant d'induction de la souche IOEB CiNe *via* le mécanisme d'immunité à la surinfection. Si les phages C sont présents, matures et actifs, leur développement sous la forme de plages sera donc plus facilement visible en l'absence des plages formées par le type A. L'expérience a montré l'absence totale de plages, même lorsque le lysat d'induction pur a été testé. Ceci suggère que le phage C est défectif chez la souche IOEB CiNe. L'hypothèse expliquerait la rareté des phages C libres, et peut être son élimination progressive dans les génomes de *O. oeni*.

**En conclusion**, nous avons observé une induction chez la majorité des prophages testés des types A, B et D. L'analyse *in-silico* est confortée *in-vivo* et les trois groupes correspondent à des phages actifs. Le niveau d'induction spontanée est variable selon le type de phage. La maintenance du prophage est assurée par des mécanismes complexes. La présence du répresseur phagique CI, empêche la transcription des gènes lytiques et assure le maintien de la lysogénie. L'absence d'excision en conditions de culture en MRS observée chez les prophages de type D suggère une forte stabilité de la répression, qui est rarement retrouvée chez les types A et B. Une attention particulière sera donc à porter au module d'intégration des phages de type D lors des analyses de comparaisons génomiques (Chapitre II). Nous n'avons pas pu mettre en évidence une réelle induction de prophages de type C. Nos résultats suggèrent une excision normale ou anormale de l'ADN viral, non suivie d'une libération de particules.

Enfin, l'apparition de dérivés virulents de phages après induction à la MC avait été observée chez *O. oeni* par (Arendt *et al.*, 1990). Un phénomène similaire a également été observé lors des essais d'induction de la souche IOEB 8417, et des plages claires ont été visualisées après propagation du lysat sur *O. oeni* IOEB S277. Si la nature lytique des phages induits est vérifiée, leur émergence au cours d'une FML ou bien lors de la production et de la stabilisation des levains constituerait un danger potentiel.

**Tableau X. Répartition des différentes séquences phagiques chez *O. oeni*.**

Souches	Groupe MLST	AttB <sub>A</sub> OE0E_t05_06		AttB <sub>H</sub> OE0E_t05_30		AttB <sub>C</sub> OE0E_t06_85		AttB <sub>E</sub> OE0E_t06_85		AttB <sub>G</sub> OE0E_t06_98		AttB <sub>B</sub> OE0E_t08_51		AttB <sub>F</sub> OE0E_t09_23		AttB <sub>I</sub> OE0E_t12_13		AttB <sub>D</sub> OE0E_t13_59			
		φA	i H <sub>1</sub>	i H <sub>2</sub>	φC	i E	i G	φB	i F <sub>1</sub>	i F <sub>2</sub>	i I <sub>1</sub>	i I <sub>2</sub>	φD	i D <sub>1</sub>	i D <sub>2</sub>						
IOEB 0502	B																				
ATCC BAA-1163	B																				
S12	B																				
S13	B																				
IOEB C23	B																				
IOEB 0501	B																				
IOEB 9304	B																				
IOEB C28	B																				
AWRIB418	B																				
IOEB 9803	B																				
IOEB 9805	B																				
IOEB 8417	B																				
AWRIB429	A																				
AWRIB568	A																				
AWRIB576	A																				
S23	A																				
IOEB 0608	A																				
S11	A																				
AWRIB202	A																				
IOEB CiNe	A	*																			
AWRIB304	A																				
S28	A																				
AWRIB318	A																				
IOEB 9517	A																				
IOEB L65_2	A																				
IOEB S450	A																				
IOEB L40_4	A																				
IOEB 1491	A																				
S19	A	o			o																
AWRIB553	A																				
IOEB L18_3	A																				
IOEB B10	A																				
IOEB S277	A																				
S15	A																				
S161	A																				
AWRIB129	A																				
IOEB S436a	A																				
VF	A																				
AWRIB419	A																				
PSU-1	A																				
S14	A																				
AWRIB422	A																				
IOEB B16	A																				
IOEB 0205	A																				
AWRIB548	A																				
S25	A																				
S22	A																				
IOEB 0607	A																				
IOEB L26_1 <sup>b</sup>	A																				
IOEB C52	C																				
<b>Total phages &gt; 30 kb</b>		<b>18</b>			<b>6</b>				<b>3</b>									<b>10</b>			

Vérification des statuts réalisées par PCR : (o) non intégrés, (\*) intégré.

## 7. Des sites secondaires contiennent des îlots génomiques

L'analyse systématique des sites *tRNA* a été réalisée, et nous a conduit à l'identification de différents îlots génomiques, de taille inférieure à celle des prophages, et dont la majorité ont une origine virale. Ces régions peuvent correspondre à des prophages défectifs ayant perdu une partie de leurs gènes. Leur présence et contenu renseigneront sur la dynamique des prophages chez *O. oeni*. Par ailleurs, des éléments génétiques mobiles de type ICE (« Integrative Conjugative Element »), ou PRCI (« Phage Related Chromosomal Island ») existent chez les bactéries à Gram<sup>+</sup> comme *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Lc. lactis* ou encore *E. faecalis* (Novick *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2013). Ce sont des structures complexes contenant des séquences d'origine virale, et/ou plasmidique qui utilisent la RSS. Leur transfert est complexe, et est assuré par un mécanisme de conjugaison (ICE), ou *via* un piratage des protéines de capsid d'un prophage helper (PRCI). Les ICE sont souvent intégrés dans des gènes *tRNA* (Menard & Grossman, 2013). Les PRCI sont plutôt intégrés au sein de gènes codant des protéines, mais l'élément pp5 a été récemment associé à un gène *tRNA<sup>thr</sup>* chez *E. faecalis* (Matos *et al.*, 2013). Les deux types d'éléments portent des fonctions importantes pour les capacités d'adaptation. Parfois l'effet sur l'hôte est lié à la capacité des PRCI de moduler leur intégration/excision. Chez *S. pyogenes*, des îlots s'intègrent dans, ou à proximité du gène *mutL*. L'excision et la réintégration du PRCI modifient le phénotype mutateur au cours de la croissance (Scott *et al.*, 2008; Nguyen & McShan, 2014).

Dans le cas des PRCI, les structures interagissent avec les phages résidents ou surinfectant la souche (Asadulghani *et al.*, 2009; Novik *et al.*, 2010).

Selon Novick *et al.* (2010), les PRCI ne doivent pas être considérés comme défectifs (ou remnants), mais comme représentant une branche menant des phages purement lytiques aux phages tempérés. Dans la mesure où l'expression génique et la mobilité des régions identifiées chez *O. oeni* n'ont pas été analysées, ces séquences ont été rassemblées sous le terme d'îlot génomique. Leur répartition est présentée dans le **tableau X**.



### 7.1. Ilôt présent au site *attB<sub>E</sub>*

Cette région, dite ilôt<sub>E</sub> de 5,2 kb est retrouvée à proximité immédiate du site *attB<sub>C</sub>* (les deux sites sont distants de 19 pb) chez *O. oeni* PSU-1 (**Fig. 20**). L'ilôt<sub>E</sub> n'est présent que chez les souches du phylo-groupe A et C. Aucune des souches du phylo-groupe B analysées dans cette étude ne le possède. La région a été identifiée au laboratoire en 2009, lors d'expériences de comparaisons génomiques entre différentes souches de *O. oeni* par hybridation soustractive (Bon *et al.*, 2009). L'ilôt est composé de cinq cadres de lecture, dont l'un est associé à une protéique hypothétique (HPφA2) retrouvée chez le phage A2 infectant *Lactobacillus casei* (OEOE\_0686 chez *O. oeni* PSU-1). En analysant plus finement la région non-codante en amont de ce gène, une signature de la présence d'une relique d'intégrase homologue à celle du phage fOgPSU-1 est retrouvée. Les quatre *orfs* en aval de HPφA2 sont associés à une invertase (OEOE\_0687), deux protéines de surface cellulaire (OEOE\_0689 et OEOE\_0690) et une protéine extracellulaire (OEOE\_0688) respectivement. L'ilôt<sub>E</sub> est flanqué par deux séquences directes répétées correspondant à un site d'attachement ancestral que nous avons nommé *attB<sub>E</sub>* (**Fig. 19 & 20**). Alors que seul l'ilôt<sub>E</sub> est intégré dans la région *attB<sub>E</sub>* chez PSU-1, il y a coexistence des deux formes dans leurs sites respectifs, c'est à dire le prophage complet de type C et l'ilôt, chez les souches AWRIB202, IOEB CiNe, AWRIB304, S28 et AWRIB318.

Nous avons montré précédemment l'incapacité des prophages de type C des souches IOEB CiNe et S28 à produire des particules infectieuses de type C en présence de MC. Il est possible qu'une interférence dans l'excision de l'ADN viral soit créée par la proximité de l'ilôt<sub>E</sub> (à 15 bp). Une excision erronée empêcherait le cycle lytique des phages de type C. La présence de l'ilôt pourrait également limiter l'intégration de ces phages dans le génome bactérien.

### 7.2. Ilôts présents au site *attB<sub>D</sub>*

Le site *attB<sub>D</sub>* est ciblé par les prophages de type D. Cependant quelques souches ont un ilôt intégré dans ce site, en lieu et place du prophage. Deux structures D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> sont trouvées et aucune séquence répétée n'est associée à leurs extrémités.





L'ilôt D<sub>1</sub> a une taille de 7 kb et présente un pourcentage en GC de 32,2 % ce qui suggère son origine exogène. Son organisation est présentée sur la **figure 20**. Il est présent chez cinq souches (ATCC BAA-1163, IOEB 0502, IOEB 0501, S12 et S13). Il ne contient pas d'intégrase, ni de motifs ou de séquences associées aux éléments mobiles (*IS*, transposons). L'origine phagique de cet ilôt est discutable. La recherche d'homologues apporte une prédiction de fonction pour trois des sept cadres de lecture. Les séquences présentent des homologies avec une protéine de transport membranaire de la sous-famille EmrB/QacA chez *Clostridium intestinale*, un régulateur transcriptionnel et une glycosyl-transférase chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* respectivement. La présence d'un gène codant une glycosyl-transférase sur une région variable est très intéressante. En effet l'enzyme est responsable de la synthèse de  $\beta$ -glucanes et de son exportation à travers la membrane bactérienne (Rini *et al.*, 2009). La présence de ce gène est caractéristique des souches de Pédicoques responsables de la maladie des vins filants. Il est aussi retrouvé chez quelques souches de *O. oeni* mais sa présence n'est pas associée à la maladie (Werning *et al.*, 2006; Dols-Lafargue *et al.*, 2008). Il pourrait protéger la bactérie vis-à-vis des contraintes environnementales, et favoriser l'aptitude de la souche porteuse à adhérer aux surfaces.

L'ilôt D<sub>2</sub> correspond à une région de 15 kb et est associé à une seule souche, la souche australienne AWRIB129. L'ensemble de la séquence présente un pourcentage de GC % assez proche de celui de l'espèce (37,1 %). Aucun gène associé à des protéines d'encapsulation n'est présent. La structure générale, ainsi que les fonctions putatives attribuées aux différents cadres de lecture montrent qu'il s'agit plus d'un plasmide intégratif que d'un prophage. En effet, on note la présence de cadres de lecture codant une recombinase, une excisionase, une protéine de réplication ainsi qu'une protéine de division cellulaire. L'analyse de phylogénie des intégrases montre bien que la recombinase est la plus distante et forme un groupe à part (**Fig. 22**). Son origine non virale est donc probable.

Les ilôts D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> ne sont pas associés avec un prophage complet au site *attB<sub>D</sub>* chez *O. oeni*. La seule exception est la souche S13, où l'ilôt de type D1 co-existe avec un phage de type D (**Fig. 20**). L'examen de cette souche est intéressant car *O. oeni* S13 possède un « demi-site » droit (*attR*) (73 pb sur les 140 pb). La même séquence "tronquée" correspond au site *attB<sub>D</sub>* associé aux souches non lysogènes IOEB 0501, IOEB 0502, S12 et ATCC 1163-BAA. Nous proposons que ce site de 73 pb résulte d'une délétion au site *attB* suite à

Tableau XI. Contenu en *orfs* des îlots F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>.

Type îlot	Protéine		BestBlastHit (% id; e-value; % residue identity)		
	Taille (bp)	GC %			
Îlot F <sub>1</sub> IOEB C23	591	37,1	196	integrase from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32679.1 ): 55% id ; 4e-62 ; 141/197	
	384	31,5	127	integrase from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32679.1 ): 45% id ; 2e-27 ; 83/132	
	156	30,8	51	orpheline	
	723	39,3	240	tcdA-E operon negative regulator from <i>Leuconostoc gelidum</i> (WP_010016311.1 ): 51% id ; 2e-38 ; 113/176	
	300	35,7	99	HP from <i>Clostridium bolteae</i> (WP_002578854.1 ): 47% id ; 1e-20 ; 63/97	
	279	33	92	HP from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_015380505.1 ): 47% id ; 1e-14 ; 50/79	
	318	31,4	105	Cro/C1 family transcriptional regulator from <i>Pediococcus pentosaceus</i> (WP_023440064.1 ): 50% id ; 3e-29 ; 78/111	
	231	42	76	orpheline	
	195	30,8	64	orpheline	
	186	29	61	orpheline	
	261	32,9	86	orpheline	
	162	35,8	53	orpheline	
	396	42,2	131	orpheline	
	927	38,6	308	HP from <i>Enterococcus faecalis</i> (WP_025190771.1 ): 29% id ; 2e-25 ; 153/302	
	717	43,5	238	phage nucleotide-binding protein from <i>Lactobacillus buchneri</i> (gb EEI19616.1 ): 37% id ; 1e-35 ; 127/240	
	573	44	190	HP from <i>Lactobacillus</i> phage phiPYB5 (gb ADA79919.1 ): 32% ; 3e-13 ; 92/194	
	921	38,9	306	phage replisome organizer protein from <i>Enterococcus faecium</i> (WP_016611909.1 ): 54% id ; 6e-81 ; 182/263	
	153	41,2	50	orpheline	
	357	37	118	phage endolysin from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10705.2 ): 62% id ; 2e-30 ; 90/118	
	354	37,8	117	phage holin from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10706.1 ): 93% id ; 2e-57 ; 100/100	
	405	38	134	glyoxalase family protein from <i>Bacillus</i> sp. JCM 19045 (dbj GAF11662.1 ): 51% ; 6e-42 ; 95/131	
	147	40,8	48	orpheline	
	960	32,3	319	HP protein from <i>Lactobacillus gallinarum</i> (WP_025005387.1 ): 30% id ; 2e-38 ; 176/313	
	243	30,9	80	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAS47900.1 ): 91% id ; 2e-46 ; 78/80	
	1143	41,2	380	site-specific DNA methylase from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_003645615.1 ): 82% id ; 0 ; 340/379	
	1206	35,6	401	restriction endonuclease from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_003645614.1 ): 54% ; 5e-140 ; 279/414	
	1845	35,9	614	putative helicase from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_003645613.1 ): 63% id ; 0 ; 499/617	
	417	36,5	138	very-short-patch mismatch repair endonuclease from <i>Lactobacillus succicola</i> (dbj GAJ25585.1 ): 74% id ; 2e-69 ; 117/135	
	615	32	204	prophage P1 protein 5, superinfection exclusion from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_011101079.1 ): 41% id ; 1e-24 ; 104/174	
	135	29,6	44	orpheline	
	Îlot F <sub>2</sub> IOEB C52	147	33,3	48	orpheline
		423	35	140	integrase from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32679.1 ): 55% id ; 9e-41 ; 100/141
381		33,6	126	integrase from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32679.1 ): 49% id ; 3e-22 ; 70/115	
411		35	136	peptide ABC transporter permease from <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremaris</i> TIFN8 (gb EQC83251.1 ): 96% id ; 9e-09 ; 26/26	
138		30,4	45	orpheline	
732		39,1	243	tcdA-E operon negative regulator from <i>Leuconostoc gelidum</i> (WP_010016311.1 ): 52% id ; 2e-39 ; 113/176	
123		41,5	40	orpheline	
189		30,7	62	HP from <i>Clostridium bolteae</i> (WP_002578854.1 ): 52% id ; 7e-07 ; 33/46	
990		40,6	329	phage endolysin from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32671.1 ): 84% ; 0 ; 300/330	
366		36,1	121	phage holin from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10706.1 ): 90% id ; 7e-55 ; 97/100	
1095		26,3	364	orpheline	
243		32,1	80	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOgPSU-1 (emb CAF32665.1 ): 94% id ; 6e-47 ; 78/80	
870		33,8	289	AraC family transcriptional regulator from <i>Clostridium cellulovorans</i> (WP_010073659.1 ): 34% id ; 5e-44 ; 159/293	
597		38	198	galactoside O-acetyltransferase from <i>Lactobacillus parafarraginis</i> (WP_008215529.1 ): 61% id ; 4e-85 ; 153/195	
633		33,5	210	phosphoglycolate phosphatase from <i>Lactobacillus brevis</i> (WP_003553440.1 ): 46% id ; 1e-59 ; 128/210	
462		36,6	153	HP from <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (WP_004914370.1 ): 38% id ; 9e-19 ; 72/130	
987		33	328	HP from <i>Lactobacillus oryzae</i> (dbj GAK47536.1 ): 35% id ; 7e-52 ; 184/334	
1431		30,3	476	HP from <i>Enterococcus gilvus</i> (WP_010781061.1 ): 33% id ; 1e-34 ; 204/446	
717		31,2	238	prophage P1 protein 5, superinfection exclusion from <i>Lactobacillus plantarum</i> (WP_011101079.1 ): 43% id ; 6e-24 ; 95/151	
162		36,4	53	orpheline	
198	29,3	65	unknown protein from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10710.1 ): 39% id ; 4e-06 ; 41/64		

Pour faciliter la lecture du tableau les séquences des intégrases sont surlignées en bleu, celles du module de lyse en violet (endolysine et holine), et les mécanismes de résistance aux phages en vert.

Deux régions supplémentaires sont présents chez l'îlot F<sub>1</sub> : un répresseur putatif (surlignée en marron), et un module de réplication (surlignée en orange).

l'intégration de l'ilôt D<sub>1</sub>. Cet événement a pu être suivi par l'intégration d'un phage de type D au niveau du site tronqué, générant l'organisation de S13. Cette hypothèse suggère qu'un demi-site *attB<sub>D</sub>* est toujours fonctionnel pour l'intégration du phage. Le scénario n'a pas pu être vérifié expérimentalement en testant si l'infection des souches IOEB 0501, IOEB 0502, S12 et ATCC 1163-BAA par un phage de type D tempéré génère des plages troubles, suggérant la lysogénéisation effective. En effet, toutes ces souches sont résistantes aux phages. Un second scénario ne peut être exclu, dans lequel l'intégration de l'ilôt D1 s'est réalisée dans le site *attR* de 140 pb d'une souche lysogène pour un phage D, délétant le site (organisation de S13). Etant donné que l'excision du phage de type D de S13 est obtenue sous MC, un site minimal de 73 pb serait donc suffisant pour la recombinaison dans ce cas.

### 7.3. Ilôts au site *attB<sub>F</sub>*

Le site *attB<sub>F</sub>* (OEOE\_t0923, Gene ID : 4416926) correspond à l'extrémité d'un gène *tRNA<sup>Leu</sup>* (c'est le troisième gène *tRNA<sup>Leu</sup>* ciblé par une insertion dans le génome de *O. oeni* qui en compte cinq) (**Fig. 19**). Les gènes OEOE\_0921 et OEOE\_0922 codent également deux *tRNA*. Deux ilôts de taille (19,5 kb et 14,5 kb) et d'organisation différentes ont été identifiés chez les souches IOEB C23 et IOEB C52, respectivement (ilôts F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>). Ce type d'élément est donc rare dans l'espèce *O. oeni*. Les deux souches partagent une même origine qui est le cidre. De plus, la souche IOEB C52 est la seule représentante du groupe MLST C.

Les ilôts contiennent un gène d'intégrase scindé en deux *orfs*. L'organisation générale des gènes ainsi que les fonctions putatives attribuées aux *orfs* identifiés suggèrent que les ilôts sont des prophages ayant perdu une grande majorité de leurs gènes (**Tab. XI**). L'orientation des gènes est identique à celle trouvée chez les prophages complets. Les deux structures ont quelques gènes en commun en aval de l'intégrase, dont un *orf* codant un régulateur négatif de la toxine TcdA-E de *L. gelidum* et une protéine hypothétique de *Clostridium bolteae*. Ils ont des gènes associés au mécanisme de répllication, mais ne codent pas de fonctions associées à l'encapsidation. Un module de lyse est également présent, et la holine correspond à celle associée au phage fOg44. Le gène de l'endolysine est tronqué chez les deux ilôts (les tailles sont de 357 pb et 990 pb chez IOEB C53 et IOEB C52 respectivement). Enfin, un module distal est présent et représente plus de la moitié de la

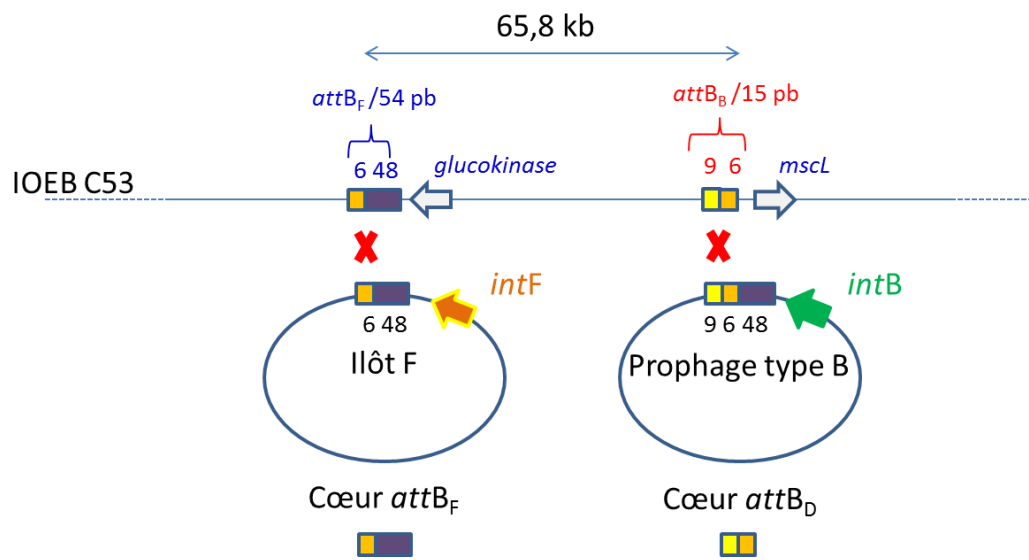


Figure 26. Homologie entre les sites  $attB_F$  et  $attB_B$ .

taille totale de l'îlot (10 kb). Cette région possède une variété de gènes très intéressante pour l'hôte bactérien. Chez *O. oeni* IOEB C23, le module est associé à deux mécanismes naturels de résistance aux phages: un système R/M ainsi qu'une protéine Sie putative dont l'homologue protéique correspond à une lipoprotéine (Labrie *et al.*, 2010) (**Tab. XI**). Des protéines homologues sont trouvées chez *Lb. plantarum*. La protéine Sie-like est également associée au module distal de l'îlot abrité par *O. oeni* IOEB C52. Chez cette souche, on note également la présence de gènes associés à un régulateur transcriptionnel; une galactoside acyltransférase, enzyme impliquée dans la détoxification de la cellule chez *E. coli* (Wang *et al.*, 2002) et enfin une phosphoglycolate phosphatase, enzyme responsable de la conversion du 2-phosphoglycolate en glycolate chez *E. coli* (Teresa Pellicer *et al.*, 2003).

Les îlots F sont bordés par deux séquences de 54 pb, nommé coeur  $attB_F$ . De façon surprenante, une courte séquence interne de 6 pb est également retrouvée au niveau de la région du site  $attP$  associée aux phages de type B. Elle est contiguë au site coeur  $attP_B$  du phage  $\phi 10MC$  (**Fig. 26**). Les deux sites B et F sont distants de 65,8 kb sur le chromosome.  $\phi 10MC$  possède les deux sites coeur  $attP_B$  (9 + 6 pb) et  $attB_F$  (6 + 48 pb). Nous avons vérifié par PCR sur 20 colonies que l'intégration du phage dans le génome se fait toujours au site  $attB_B$ . Il semble donc que l'association  $attB$  (15 pb) avec l'intégrase de type B oriente l'intégration au site  $attB_B$ . L'association  $attB_F$  (6 + 48 pb) avec une intégrase différente, oriente vers le site « F » de 55 pb. Cette intégrase atypique, associée à l'îlot F est proche des intégrases de type D (**Fig. 22**). La présence de l'îlot F indique peut être l'existence d'un autre groupe d'oénophages portant un autre type d'intégrase, ciblant le site F pour la RSS. La complexité des sites ciblés par les îlots F, la rareté de leur distribution dans l'espèce et leur association avec les souches de cidre suggèrent qu'il confère des fonctions spécifiques à cette niche particulière et nécessitent des études complémentaires.

#### 7.4. Îlots au site G

Il s'agit de la région la plus courte (243 pb) parmi les îlots identifiés. Son insertion est identifiée dans le gène  $tRNA^{Glu}$  (OEOE\_t0698) dans tous les génomes analysés. Sa présence avait été décrite précédemment chez quelques souches (São-José *et al.*, 2004). Ce site est localisé à 11,5 kb en aval de site  $attB_C$  (**Fig. 19**). Comme évoqué pour les îlots F, la séquence

**Tableau XII. Contenu en orfs des îlots H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>.**

Type remnant			Protéine		
	Taille (bp)	GC %	Taille (aa)	BestBlastHit (% id; e-value; % residue identity)	
Îlot H <sub>1</sub> AWRIB422 9,9 kb	480	34,4	159	orpheline	
	1110	26,8	369	transcriptional regulator, AraC family from <i>Leuconostoc kimchii</i> (gb ADG41116.1 ) : 36% id ; 4e-46 ; 159/268	
	312	43,3	103	orpheline	
	2112	41	703	adhesin from <i>Lactobacillus suebicus</i> (WP_010622504.1): 56 % id ; 0 ; 464/672	
	555	33,3	184	orpheline	
	912	36	303	Phage protein from <i>Alkalibacterium</i> sp. AK22 (gb EXJ24415.1 ): 24% id ; 2e-17 ; 145/308	
	165	26,7	54	orpheline	
	192	34,4	63	orpheline	
	189	29,6	162	HP from <i>Atopococcus tabaci</i> (WP_028273897.1 ) : 51% id ; 2e-05 ; 28/39	
	1014	28,2	337	Cro/Cl family transcriptional regulator from <i>Lactobacillus suebicus</i> (WP_010622326.1 ) : 39% id ; 3e-05 ; 38/61	
	1170	36,8	389	integrase from <i>Enterococcus faecium</i> (WP_016922368.1 ): 36% id ; 7e-70 ; 217/377	
	Îlot H <sub>2</sub> IOEB C52 10,3 kb	115	40,4	94	orpheline
		213	42,7	70	orpheline
		357	38,7	118	DNA-binding protein from <i>Desulfotomaculum gibsoniae</i> ( WP_006521423.1 ): 49% id ; 8e-13 ; 48/67
441		43,5	146	orpheline	
336		40,8	111	orpheline	
585		37,9	194	orpheline	
144		42,4	47	orpheline	
471		45,2	156	Phage protein from <i>Enterococcus durans</i> (gb EMS75081.1 ) : 37% id ; 1e-13 ; 54/93	
555		44	184	HTH domain protein from <i>Streptococcus urinalis</i> (gb EHJ56769.1 ): 34% id ; 6e-04 ; 33/76	
192		42,2	63	orpheline	
222		38,3	73	orpheline	
963		30,6	320	DNA-binding protein from <i>Listeria monocytogenes</i> ( YP_008276896.1 ): 44% id ; 5e-08 ; 44/71	
261		43,3	86	transposase from <i>Leuconostoc citreum</i> ( WP_004906464.1 ): 99% id ; 6e-55 ; 86/86	
795		45,7	264	transposase from <i>Leuconostoc citreum</i> (WP_004906287.1 ): 97% id ; 0 ; 261/265	
546	41,4	181	integrase from <i>Weissella koreensis</i> (WP_013989179.1 ): 48% id ; 9e-47 ; 113/173		
Îlot I <sub>1</sub> 11,4 kb	516	36,6	171	putative transcription regulator from <i>Lactobacillus plantarum</i> (gb ERL44814.1 ): 82% id ; 7e-97 ; 153/168	
	942	39,2	313	ABC transporter ATP-binding protein <i>Lactobacillus coryniformis</i> (WP_010012398.1 ): 76% id ; 1e-172 ; 276/313	
	777	39	258	GntR family transcriptional regulator from <i>Lactobacillus coryniformis</i> (WP_010012399.1 ): 87% id ; 3e-144 ; 235/253	
	114	33,3	37	orpheline	
	117	32,5	38	orpheline	
	114	36,8	37	orpheline	
	744	39,8	247	integrase, partial from <i>Lactobacillus buchneri</i> (WP_003561869.1 ): 99% id ; 4e-152 ; 210/211	
	702	35,8	233	transposase from <i>Oenococcus oeni</i> PSU-1 (gb ABJ57353.1 ): 100% id ; 0 ; 247/247	
	564	36,3	187	orpheline	
	909	42	302	HP from <i>Enterococcus faecium</i> (WP_010776732.1 ): 25% id ; 1e-18 ; 140/306	
	168	33,3	55	orpheline	
	165	39,4	54	orpheline	
	126	28,6	41	orpheline	
	297	36,7	98	transcription regulator from <i>Faecalibacterium</i> sp. CAG:74 (WP_022445710.1 ): 36% id ; 5e-05 ; 40/66	
	765	34,2	254	orpheline	
	1164	40,2	387	integrase from <i>Enterococcus gallinarum</i> (WP_029487064.1 ): 38% id ; 2e-78 ; 224/382	

présente une homologie nucléotidique de 92 % avec la région *attP* d'un autre phage, ici phage fOg44 (type A), et inclut une portion de 171 nt du côté 3' du gène de l'intégrase du phage (*int<sub>44</sub>*). La présence de cette séquence peut s'expliquer par le fait qu'un oenophage était présent à cette position du génome et qu'une excision erronée s'est produite, laissant la signature virale de 243 pb dans les génomes. Le site n'est plus fonctionnel car aucun phage n'est trouvé sur ce site. D'autre part, le fait que tous les génomes aient cette même signature indique qu'il s'agit d'un phénomène ancien dans l'histoire évolutive de *O. oeni*.

### 7.5. Ilôts au site *attB<sub>H</sub>*

Deux types distincts d'ilôts peuvent occuper le site correspondant au gène *tRNA<sup>Ser</sup>* (OEOE\_t0530 ; Gene ID : 4416653) localisé 22 kb en aval du site *attB<sub>A</sub>* (**Fig. 19**). Les deux régions sont bordées par deux séquences répétées de 22 pb qui correspondent à l'extrémité 3' du gène de *tRNA<sup>Ser</sup>*. Le site *attB<sub>H</sub>* est rarement occupé, et seules deux souches sur les 50 analysées (AWRIB422 et IOEB C52) contiennent un des ilôts à ce site. Les tailles associées aux ilôts H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub> sont de 9,9 kb et 10,3 kb respectivement. Les pourcentages en GC des régions sont de 33,8 % et 39,8 % respectivement. Contrairement à la situation trouvée dans les prophages, on ne trouve pas l'intégrase à proximité du gène de *tRNA* mais à l'extrémité opposée. On note la présence d'une transposase sur l'ilôt H<sub>2</sub> (**Tab. XII**). Des protéines phagiques sont également présentes sur les deux ilôts H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>. Toutefois, de nombreuses séquences sont orphelines, et l'origine des ilôts est difficile à établir.

### 7.6. Ilôts au site *attB<sub>I</sub>*

Le site *attB<sub>I</sub>* est le premier d'un cluster de 15 gènes *tRNA* successifs. Il correspond à un gène *tRNA<sup>Ser</sup>* (OEOE\_t1213, Gene ID: 4415646) et est localisé 117 kb en aval du site *attB<sub>D</sub>* (**Fig. 19**). Le site peut présenter une insertion d'une séquence de 11,4 kb ou de 12,8 kb, dont les taux en GC sont de 36,3 % et 39,95 %, respectivement (ilôt I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub>). Il est occupé chez 48 % des souches. La distribution des deux types d'ilôt est équilibrée dans la population analysée (22 % pour la séquence de 11,4 kb et 26 % pour la séquence de 12,8 kb). Un ilôt de



**Tableau XII (suite). Contenu en orfs des îlots H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>.**

Type remnant	Protéine		Protéine	BestBlastHit (% id; e-value; % residue identity)
	Taille (bp)	GC %		
Îlot I <sub>2</sub> 12,8 kb	381	37,3	126	toxin RelE from <i>Enterococcus faecalis</i> (WP_002402127.1 ): 50% id ; 8e-32 ; 82/110
	291	41,2	96	XRE family transcriptional regulator from <i>Enterococcus raffinosus</i> (WP_028020666.1 ): 45% id ; 3e-15 ; 56/87
	198	37,4	65	orpheline
	4767	41,7	1588	endonuclease and methylase LlaGI from <i>Lactococcus lactis</i> (AF097471.1): 56% id ; 0 ; 1156/1597
	174	36,2	57	orpheline
	180	36,1	59	orpheline
	558	39,8	185	orpheline
	903	45,3	300	HP from <i>Enterococcus faecium</i> (WP_002336289.1 ) : 25% id ; 4e-15 ; 124/277
	156	37,8	51	orpheline
	198	42,9	65	orpheline
	186	36	61	orpheline
	1101	30,2	366	DNA-binding protein from <i>Clostridium hydrogeniformans</i> (WP_027633344.1 ): 37% id ; 1e-04 ; 51/87
	645	40,8	214	integrase from <i>Lactobacillus iners</i> (WP_006732597.1 ): 32% id ; 3e-17 ; 82/170
	552	45,8	183	site-specific recombinase from <i>Enterococcus casseliflavus</i> (WP_016610863.1 ): 44% id ; 1e-44 ; 116/173
	Îlot D <sub>2</sub> AWRIB129 15 kb	1272	30	423
1083		29,7	360	HP from <i>Lactococcus lactis</i> (WP_023349348.1 ): 52% id ; 6e-123 ; 253/355
357		29,4	118	HP from <i>Streptococcus suis</i> (WP_029173776.1 ): 52% id ; 4e-27 ; 84/114
219		30,1	72	XRE family transcriptional regulator from <i>Lactobacillus saerimneri</i> (gb EKW99358.1 ): 53% id ; 1e-13 ; 45/66
3201		48,5	1066	cell surface protein from <i>Leuconostoc gelidum</i> (WP_010015437.1 ): 27% id ; 5e-23 ; 394/868
1158		35,1	385	HP from <i>Pediococcus acidilactici</i> (WP_024862966.1 ) : 32% id ; 4e-07 ; 81/160
1224		35,9	407	non déterminé
327		34,6	108	non déterminé
600		40,5	199	HP from <i>Salinicoccus carniancri</i> (WP_017547421.1 ): 34% id ; 1e-09 ; 75/149
786		42,4	261	cell division protein FtsK from <i>Lactobacillus iners</i> (WP_006738238.1 ): 40% id ; 2e-62 ; 162/272
1200		36,8	399	plasmid replication family protein from <i>Streptococcus mitis</i> (gb KEQ39909.1 ): 33% id ; 5e-52 ; 205/380
318		34,3	105	excisionase from <i>Enterococcus italicus</i> (WP_007207882.1 ): 37% id ; 2e-04 ; 46/78
1248		34,5	415	site-specific recombinase from <i>Lactobacillus amylolyticus</i> (WP_006351288.1 ): 30% id ; 1e-40 ; 193/388

type I a été décrit par Borneman *et al.* (2012) mais il est intégré dans le dernier *tRNA* du cluster (OEOE\_t1227).

Les deux régions présentent à leur extrémité deux séquences répétées directes correspondant à 22 pb du côté 3' du gène de *tRNA*<sup>Ser</sup>. Les différentes fonctions putatives des *orfs* identifiés sont présentées dans le **tableau XII**. Comme pour les îlots détectés au niveau du site *attB<sub>H</sub>*, leur nature virale est également hypothétique, malgré la présence d'un gène codant une intégrase. L'îlot I<sub>2</sub> de 12,8 kb contient un *orf* codant un système R/M de type I. Les enzymes de ce type forment un système complexe, où l'enzyme multifonctionnelle est à la fois responsable de l'activité de modification ainsi que de celle de la restriction des sites cibles (Murray, 2000). La protéine déduite chez *O. oeni* possède une identité de 56 % et 52 % (E-value 0) avec LlaGI et de LIBIII, dont les gènes sont portés par des plasmides conjugatifs de *Lc. lactis*. Leur protection conférée à *Lc. lactis* vis-à-vis de nombreux bactériophages a été montrée expérimentalement (Madsen & Josephsen, 2001; Kong & Josephsen, 2002). L'acquisition de tel gène par transfert horizontal d'un plasmide peut être proposée. On note la présence d'une fonction de type RelE ce qui suggère que l'îlot code pour un système toxine/antitoxine assurant sa persistance dans la bactérie hôte.

### 7.7. Phylogénies des intégrases présentes chez *O. oeni*

Les séquences protéiques des intégrases associées aux différents prophages et îlots intégrés au sein des sites *tRNA* chez *O. oeni* ont été comparées (**Fig. 21**). Comme décrit précédemment, l'intégrase de l'îlot D<sub>2</sub> est la plus distante (**Fig. 21**). Les intégrases des îlots F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> forment un sous-groupe et sont proches des intégrases phagiques de type D. Ceci semble en accord avec notre proposition que les îlots F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> résultent d'une évolution réductive de prophages. Le contenu des îlots I et H semblait indiquer une origine non virale.

L'analyse de ces îlots est rendue difficile par le fait que beaucoup de protéines associées sont orphelines. Cependant on note que les intégrases détectées aux sites *attB<sub>J</sub>* (îlots I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub>) et *attB<sub>H</sub>* (îlots H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>) forment un cluster distinct, et sont proches des intégrases virales associées à des phages infectant d'autres BL, comme *Lb. plantarum* et *Lb.*



*buchneri*. Les homologues des intégrases sont à mettre en parallèle avec la conservation des sites d'attachement flanquant les îlots I et H (Fig. 27).

```

H1 & H2 AGTTCGAATCTCTC----TCCATCCA
I2      -GTTTGAATCCCTCAATCTCCATC-A
I1      ----CGAATCCCTCAATCTCCATC-A

```

**Figure 27. Comparaison des séquences bordant les îlots I, H et F.**

De nombreux lactobacilles partagent la niche de *O. oeni*, et sont présents dans le moût. Il est donc possible que ces séquences (*int* et *att*) soient la signature de phages ancestraux de cet écosystème. Ces phages auraient perdu progressivement une partie de leurs gènes. Ceci pourrait correspondre à une forme de domestication de ces prophages, comme proposé chez *E. coli* (Bobay *et al.*, 2014), l'hôte ne conservant que des fonctions avantageuses (mécanismes de résistance aux phages).

## 8. Conclusion du chapitre I

Nos travaux représentent la première étude *in-silico* réalisée sur les prophages de *O. oeni*. **Ces prophages sont largement répandus chez l'espèce**, ce qui souligne la prédation des phages dans l'environnement œnologique. Nos travaux confirment donc la prévalence de la lysogénie, déjà évoquée lors de différents travaux d'induction à la MC (Arendt *et al.*, 1991; Poblet-Icart *et al.*, 1998).

**La majorité des génomes phagiques identifiés sont intégrés.** La présence de séquences phagiques non intégrées dans le génome est probable et confirme les observations passées qui faisaient état d'une pseudo-lysogénie, marqué par une instabilité forte. **Les sites privilégiés pour l'insertion sont des gènes *tRNA*.** Il y en a quatre dans le chromosome, et ils sont occupés par des prophages ayant une taille supérieure à 30 kb. La majorité des sites est associée au réplicore droit. Seul le site *attB<sub>D</sub>* se trouve localisé au



niveau du réplicore gauche. **Il y a corrélation entre la séquence de l'intégrase et le site utilisé pour l'intégration** et cette observation offre une première classification des œnophages en quatre groupes (A, B, C et D). Ces données permettent également de disposer d'un **outil de détection et de typage**, puisque les phages actifs isolés de l'environnement œnologique possèdent les séquences IntA, B, C ou D. L'existence de prophages de type D n'avait pas été identifiée jusqu'à ce jour parmi les nombreux phages libres isolés dans le vin. Il ne nous est pas possible d'identifier si ces phages ont été déjà isolés auparavant. Cependant, il est possible que la stabilité particulière de la lysogénie de ces phages explique le fait qu'ils n'aient pas été caractérisés auparavant.

**Notre étude permet d'établir un premier parallèle** entre la distribution dans les quatre groupes établie pour les prophages lors de l'analyse *in-silico*, et celles des phages libres isolés du vin. Ainsi, les prophages du groupe B, rares dans les génomes, sont très répandus dans le vin. Ceci suggère que les prophages de ce type sont peut être instables, et adoptent plutôt un cycle de vie lytique. Les prophages de type C correspondent probablement à des phages défectifs, en voie de disparition dans l'espèce. Leur capacité à faire un cycle lytique pourrait être conditionnée à la présence d'un second phage. A notre connaissance, fOgPSU-1 est le seul phage actif de type C. Ce phage a été isolé après induction d'une souche lysogène. De façon surprenante, les auteurs ont noté que fOgPSU-1 était capable d'inhiber la croissance de la souche lysogène à l'origine de sa libération (Santos *et al.*, 1996).

**Les sites tRNA sont également occupés par différents îlots** d'origine virale, ou plasmidique. Aucune homologie nucléotidique avec d'autres bactéries n'a été trouvée pour ces séquences. Cependant, on peut suggérer qu'il s'agit d'une acquisition par transfert horizontal, et que le transfert s'opère entre BL de l'écosystème (Bon *et al.*, 2009; Popa & Dagan, 2011). A titre d'exemple, le transfert des transposons Tn916 et Tn925 entre *O. oeni* et *Enterococcus* sp a été rapporté et réalisé par conjugaison (Zúñiga *et al.*, 1996).

Les îlots D, H, E et G sont intégrés au niveau, ou à proximité immédiate, de sites occupés par des prophages, ce qui n'est pas le cas des îlots F.

Les îlots phagiques trouvés au site F, sont peut-être le résultat de délétions progressives d'un prophage. Ils sont retrouvés chez deux souches isolées du cidre, et une



signature de leur intégration est présente à deux régions différentes du génome. Ces observations suggèrent la présence d'un autre type d'oénophages non détecté à ce jour. Ces phages moins bien adaptés au vin, auraient alors subi une délétion progressive au cours du temps. Il est à noter que la perte de gènes ne concerne pas les fonctions pouvant apporter un avantage à l'hôte comme les systèmes de résistance aux phages (R/M, *Sie*) et il est possible que *O. oeni* à l'instar de *E. coli* domestique ses prophages (Bobay *et al.*, 2014).

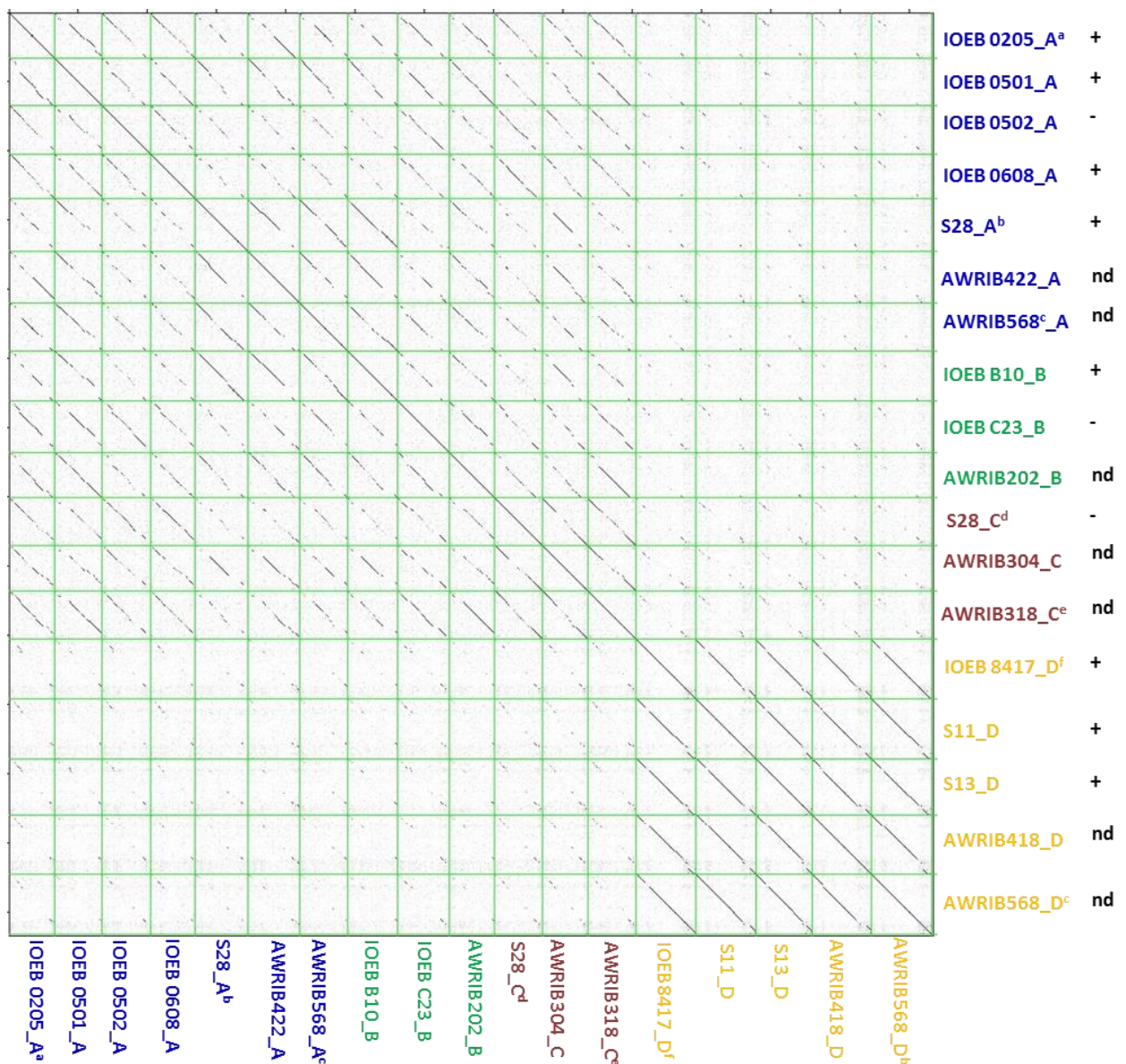
**Nos résultats confirment le rôle joué par les prophages dans la diversification de l'espèce *O. oeni*** et suggèrent leur rôle dans l'adaptation à son environnement par l'acquisition de nouveaux gènes ou *via* d'autres mécanismes. Cette forte prévalence d'éléments mobiles dans le génome de *O. oeni* est conforme à l'absence de certains gènes *mut* (*mutS* et *mutL*) décrite dans l'espèce et qui augmente la fréquence de transfert horizontal (Marcobal *et al.*, 2007). Par ailleurs aucun système CRISPR n'existe chez *O. oeni* alors qu'il est établi que le système est une ligne de défense supplémentaire, qui permet de limiter l'acquisition de prophages chez les bactéries (Nozawa *et al.*, 2011; Millen *et al.*, 2012). Il est intéressant de constater que l'espèce proche *O. kitaharae* contient un locus CRISPR et ne possède *à priori* pas de phages actifs dans son génome (Borneman *et al.*, 2012).





## **Chapitre II**

### **Génomique comparative des prophages**



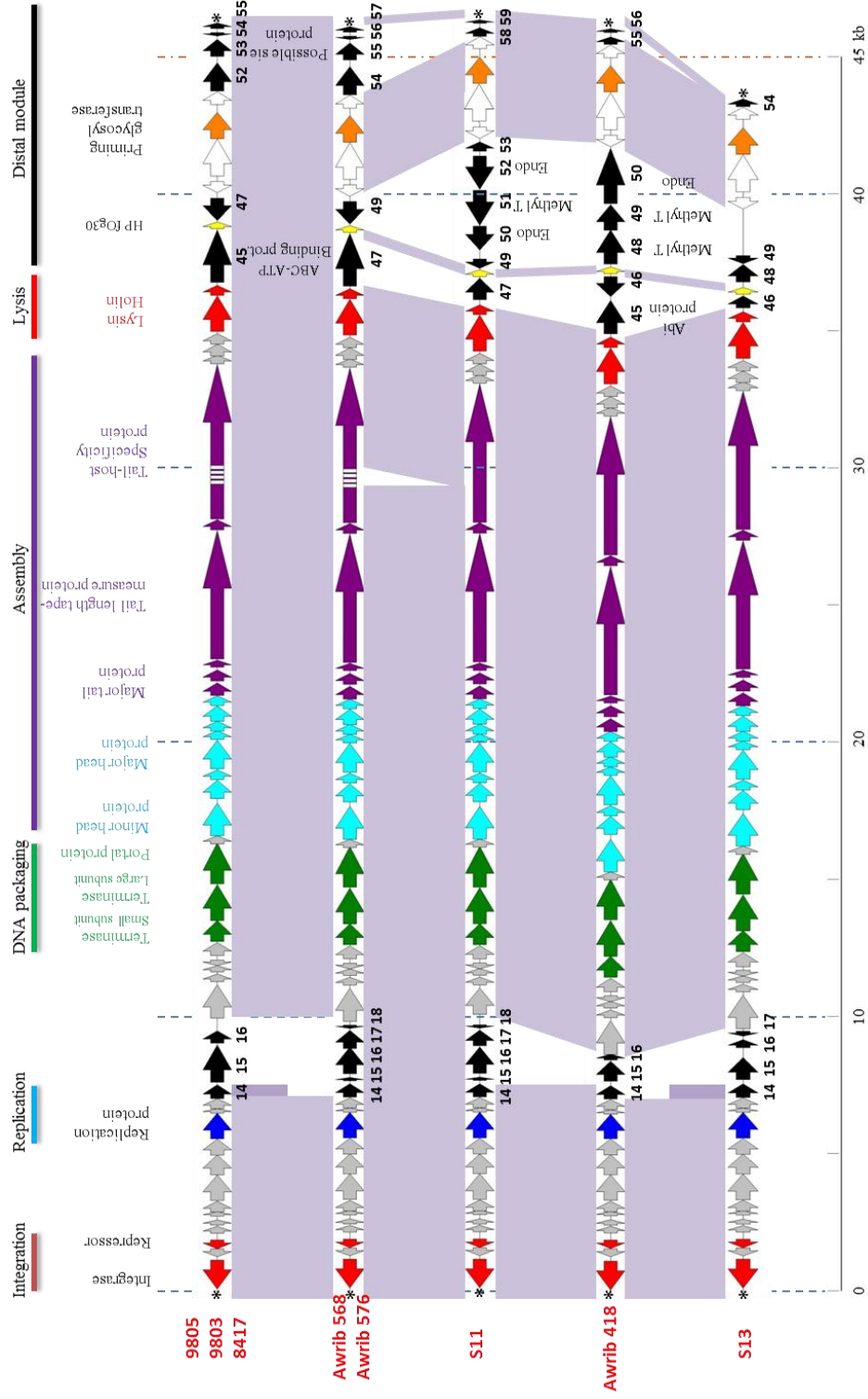
**Figure 28. Dot plot des génomes de prophages chez *O. oeni*.** Les prophages sont comparés entre eux en utilisant le logiciel Jplotter. L'inductibilité des prophages est notée + et notée - dans le cas échéant, ou nd si non déterminée. Les groupes de prophages sont présentés par un code couleur: A=Bleu; B=Vert; C=Bordeaux et D=Jaune orangé. Séquence homologue au prophage de (a) AWRIB548\_A, (b) S161, (c) AWRIB576\_A&D, (d) IOEB CiNe\_C, (e) AWRIB202\_C et (f) IOEB 9803\_D & IOEB 9805\_D.

## 1. Organisation générale des génomes prophagiques

L'induction des prophages présents dans un panel réduit de souches de *O. oeni* a été renseignée dans le chapitre précédent. Les génomes de ces prophages ont été comparés entre eux, et avec les prophages abrités par les souches australiennes (Borneman *et al.*, 2012) (dont l'inductibilité n'est pas renseignée). Les prophages partageant une homologie nucléotidique > 99 % ont été considérés identiques dans la suite du travail. L'étude a donc porté sur un ensemble de 18 génomes prophagiques. Un alignement global à l'aide du logiciel Jdotter (Brodie *et al.*, 2004) est présenté **Fig. 28**. Il donne une première image de la structure mosaïque des prophages de *O. oeni*. Le groupe D est distant des groupes A, B et C, et il est homogène. Les organisations actuelles des modules chez les phages A, B et C résultent vraisemblablement de phénomènes d'échanges de modules.

### 1.1. Gènes conservés chez tous les prophages

Les séquences nucléotidiques des prophages ont été comparées dans l'objectif d'identifier des séquences conservées partagées par tous les oenophages. Nous avons identifié deux courtes régions conservées, et elles sont internes au gène codant l'endolysine phagique. Un couple d'amorces ciblant ces deux régions a été défini, et nous a permis de mettre au point une PCR de détection des oenophages. L'amplification d'un fragment de 447 pb a été observée à partir de tous les phages isolés du vin lors de la campagne 2011. Comme chez *Lb. helveticus*, l'amplification du gène *lys* peut donc être utilisée comme moyen de détection des phages de *O. oeni* (Zago *et al.*, 2008). Cependant, lorsque le test a été étendu aux prophages, nous avons observé que seules 90 % des séquences phagiques répondent. La PCR est donc un outil complémentaire des PCR ciblant l'intégrase. Doria *et al.* (2013) ont également décrit la mise au point d'un test de détection à partir d'une région interne du gène *lys* d'oenophages. Ce couple n'a permis de détecter que 25 % des souches lysogènes présentes dans notre collection.



**Figure 29. Génomique comparative des prophages du groupe D réalisée à l'aide du logiciel Mauve.** Alignement nucléotidique des prophages présents chez les souches IOEB 9803/IOEB 9805), S11, S13 AWrib568/576 et AWrib418. Les gènes conservés entre différents prophages sont représentés sur un même fond mauve. L'organisation des prophages montre six modules dont les délimitations sont indiquées par un code couleur: rouge-lysogénie/bleue-réplication de l'ADN/vert-empaquetage de l'ADN/violet-morphogénèse de la tête et de la queue/rouge-lyse/noir-module distal. (\*) site *attL* et *attR*

## 1.2. Le groupe D est homogène et différent des autres phages

### 1.2.1. Généralités

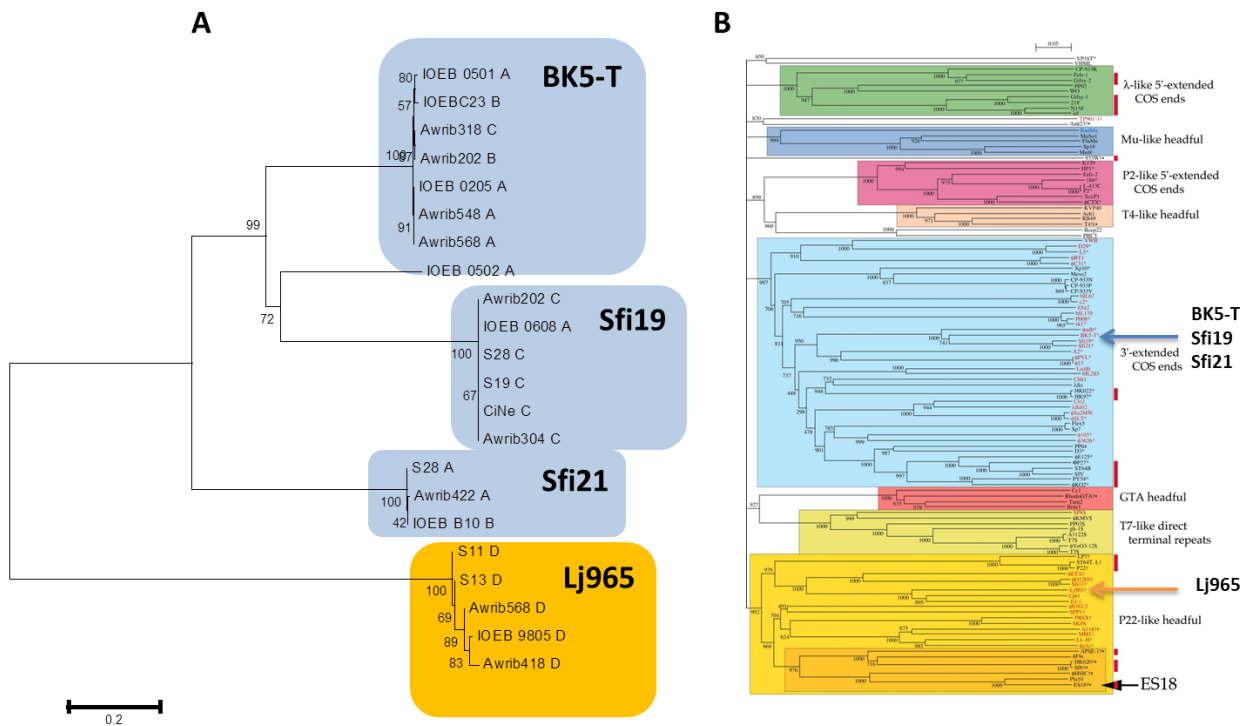
Parmi les huit prophages de type D, cinq organisations distinctes sont retrouvées. Ils correspondent aux prophages présents chez les souches IOEB 8417 (IOEB 9803/IOEB 9805), S11, S13, AWRIB568 (AWRIB576) et AWRIB418. Les génomes des trois prophages actifs sont de 46 kb (pour IOEB 8417 et S11) et 43,4 kb (pour S13). Ils ont un pourcentage en GC compris entre 38,6 et 38,9 %, en accord avec celui établi pour l'espèce *O. oeni*. Les prophages du groupe D partagent une homologie nucléotidique > 95 % et la synténie est conservée (**Fig. 29 & Tab. XIII**). Seules trois zones variables sont présentes dans les génomes. Les prophages inductibles (IOEB 8417, S11, S13) codent respectivement 55, 59 et 54 protéines. Des recherches d'homologies dans la base de données permettent l'attribution de fonction à un nombre restreint de ces *orfs* (entre 63 à 69 % du nombre total).

### 1.2.2. Génome viral « cœur » des prophages de type D

L'organisation générale des prophages de type D permet de distinguer six modules fonctionnels. Le premier module correspond à celui de la **lysogénie** et contient trois *orfs* qui sont transcrits dans le sens opposé par rapport à tous les autres gènes. Cette même orientation de la quasi-totalité des gènes n'est pas retrouvée chez les phages de *Leuconostoc* (Kot *et al.*, 2014). Le module abrite des gènes codant l'intégrase, une protéine hypothétique et un répresseur putatif. Ce dernier est une protéine de 103 acides aminés, possédant un domaine HTH de la famille de répresseur *ci*. Les répresseurs des prophages de type D ont une forte homologie avec le répresseur du phage LP-101 de *Listeria monocytogenes* (Denes *et al.*, 2014). Des homologies entre des phages infectant *L. monocytogenes* et la BL *Lc. lactis* ont été décrits, et s'expliquent de par l'existence d'un ancêtre commun (Dupuis & Moineau, 2010). Aucune fonction n'a pu être attribuée à la protéine hypothétique localisée entre le gène de l'intégrase et le répresseur. Toutefois, cette petite protéine de 83 acides aminés présente un domaine conservé de fonction inconnue de la famille DUF955. Cette famille de protéine présente un motif de métallopeptidase (*mpm*). La présence de cette structure dans l'ordre *int-mpm-ci* est courante chez les phages tempérés des bactéries Gram<sup>+</sup> à bas GC

Tableau XIII. Conservation nucléotidique des prophages du groupe D.

	AWRIB576_D	S11_D	S13_D	IOEB9805_D	AWRIB418_D
AWRIB576_D	---	97.43	97.37	98.29	96.05
S11_D	97.19	---	97.36	95.69	95.53
S13_D	97.45	97.26	---	96.59	95.55
IOEB9805_D	98.28	95.99	96.54	---	96.1
AWRIB418_D	95.38	95.51	95.84	95.72	---



**Figure 30. Stratégie d'empaquetage de l'ADN chez les oenophages.** **A.** Alignement des séquences protéiques de la grande sous-unité de la terminase des différents types d'oenophages. L'arbre est obtenu par la méthode "neighbor-joining" en utilisant le logiciel MEGA. Les séquences sont classées en quatre groupes selon l'homologue retrouvé par Blastp chez des génomes de phages disponibles en banques. **B.** Arbre phylogénétique de la grande sous-unité de la terminase de 123 bactériophages (adapté de Casjens & Gilcrease, 2009). L'arbre est obtenu par la méthode "neighbor-joining". Les différentes stratégies d'empaquetage de l'ADN utilisées par ces phages sont indiquées. Les deux flèches orange et bleue indiquent la position des phages BK5-T, Sfi19, Sfi21 et Lj965 sur l'arbre.

(Lucchini *et al.*, 1999b). Le module de la lysogénie est spécifique du groupe D, et confère aux prophages une stabilité supérieure de l'intégration par rapport aux membres des autres groupes.

**La délimitation du module de réplication** est difficile à réaliser. En effet, aucune fonction n'est attribuée aux *orfs* 4, 5, 6, 8, 10 et 12. Toutefois, la présence de domaines conservés au sein des protéines déduites des *orfs* 9 et 11 permet de leur attribuer une fonction putative. Ils s'agit d'une protéine de liaison à l'ADN dont un homologue est retrouvé chez le phage DT1 de *S. thermophilus* (Tremblay & Moineau, 1999), et d'une protéine de réplication.

Les **modules** associés aux étapes **d'encapsidation** de l'ADN ainsi que de la **morphogénèse** de la tête et de la partie caudale sont identifiés de façon plus claire *via* l'interrogation Blast. Les deux premiers *orfs* du module d'encapsidation de l'ADN sont associés aux deux sous-unités de la terminase, *terL* et *terS*, qui jouent un rôle-clé dans l'empaquetage de l'ADN. Le gène codant la protéine portale est retrouvé en aval de ces gènes. Ces protéines ont pour rôle de former un canal pour faciliter l'encapsidation de l'ADN et son éjection lors d'une infection (Isidro *et al.*, 2004). L'analyse de *terL*, peut permettre de déterminer le type d'empaquetage de l'ADN viral (Casjens & Gilcrease, 2009). En effet, la protéine codée par ce gène détermine le type d'extrémités de l'ADN phagique et fait partie des séquences conservées chez les *Caudovirales* (Casjens, 2003). La protéine TerL a été comparée aux protéines homologues présentes dans les banques de données (**Fig. 30**). L'analyse suggère un mode d'encapsidation non *cos*. Ce résultat est original, car tous les oenophages décrits jusqu'à présent ont des extrémités cohésives, dont la présence a été démontrée expérimentalement (Gindreau *et al.*, 1997; Nel *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1998; Tenreiro *et al.*, 1993).

L'identification du groupe de protéines associées à la **formation de la capsid** (appelé conectique head/neck/tail) a été facilitée par l'utilisation de la plateforme Virfam (Guerois, poster 161, VoM, Zurich, 2014). La classification est basée sur l'ordre précis des gènes, et la distance entre les *orfs*. Le logiciel compare ces séquences avec les homologues existants dans la base de données « Aclame bacteriophages » (Leplae *et al.*, 2004). L'analyse Virfam place les prophages du groupe D dans le cluster 1 (SPP1-like) qui rassemble une grande



**Tableau XIV. Recherche d'homologie des *orfs* spécifiques des prophages du groupe D.**

Souches	Gène			Taille (aa)	Best Blast Hit (% id; e-value; % residue identity)
	N°	Taille (bp)	GC %		
IOEB 9805	15	1335	32.4	444	HP from <i>Lb. vini</i> (WP_010579731.1): 43% id; 8e-111; 443/444
	16	450	29.5	149	HP from <i>Lb. vini</i> (WP_010579732.1): 48% id; 3e-25; 122/149
	45	1881	28.1	626	AAA domain protein from <i>S. mitis</i> SK579 (gb EID31554.1 ): 36% id ; 3e-98; 544/626
	47	810	29.5	269	HP from <i>Lb. casei</i> (WP_003603662.1): 29% id; 3e-11; 132/269
	52	1020	36.9	339	HP OEOE_0686 <i>O. oeni</i> PSU-1 (YP_810287): 97% id; 3e-66; 107/339
	53	615	32.3	204	prophage P1 protein 5, superinfection exclusion (cell surface N-anchored) from <i>Lb. plantarum</i> WCFS1 (YP_004888620.1): 41% id; 6e-26; 174/204
	54	129	25.6	42	none
	55	201	34.3	66	HP from <i>W. paramesenteroides</i> ATCC 33313 (gb EER74952.1 ) : 42% id ; 9e-07 ; 53/66
IOEB Sarco11	14	480	35.6	159	none
	15	117	23.1	38	none
	16	951	31.0	316	HP from <i>S. suis</i> D12 (YP_006081640.1): 31% id; 5e-31; 306/316
	17	564	29.8	187	HP from <i>S. agalactiae</i> (WP_000427215.1): 35%; 1e-15; 155/187
	18	117	24.8	38	none
	47	777	32.0	258	HP from <i>C. hathewayi</i> (WP_006780132.1): 40% id ; 4e-42;257/258
	49	327	28.7	108	HP from <i>L. vaginalis</i> (WP_003717196.1): 43% id; 5e-05 ; 49/108
	50	858	28.8	285	none
	51	1260	34.6	419	Putative uncharacterized protein from <i>Lactobacillus</i> sp.66c (WP_009557716.1): 53% id; 6e-149; 419/419
	52	1194	36.2	397	cytosine-specific methyltransferase <i>L. fallax</i> (WP_010007034.1): 64% id, 0; 397/397
	53	339	35.7	112	DNA mismatch endonuclease Vsr <i>Lb. parafarraginis</i> F0439 (gb EHL95521.1 ): 73% id; 6e-53; 112/112
59	126	32.5	41	none	
IOEB Sarco 13	15	789	31.3	262	HP from <i>E. faecalis</i> (WP_010709725.1): 55 % id; 3e-95; 256/262
	16	300	31.0	99	HP from <i>Dehalococcoides mccartyi</i> DCMB5(YP_007483051.1): 30% id; 1e-06; 99/99
	17	177	27.7	58	none
	46	432	36.3	143	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase from <i>Lb. acidipiscis</i> (WP_010495368.1): 61% id; 2e-50; 132/143
	48	759	29.4	252	none
	49	294	26.5	97	none
AWRIB418	15	720	28,2	239	none
	16	213	28.6	70	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (emb CAD19133.1 ): 87% id; 2e-36; 70/70
	45	1194	27.5	397	Abi family protein from <i>O. oeni</i> (WP_002822293.1): 100% id; 0; 397/397
	46	714	23.8	237	none
	48	1218	31.0	405	modification methylase from <i>O.oeni</i> (WP_002822290.1): 100% id; 0; 405/405
	49	921	28.0	306	modification methylase from <i>O.oeni</i> (WP_002822289.1): 100% id; 0; 306/306
	50	1992	28.8	663	type Is restriction endonuclease from <i>O. oeni</i> (WP_002822288.1): 100% id; 0; 663/663

majorité de Siphophages (45 sur 49) et quelques Myophages. Ce cluster regroupe d'autres phages infectant des BL comme le  $\phi$ 2972 infectant *S. thermophilus*, et le prophage Lj965 de *Lb johnsonii* (Ventura *et al.*, 2004; Lévesque *et al.*, 2005). Cette classification différencie à nouveau les oenophages du groupe D des autres types d'oenophages. En effet, ces derniers sont retrouvés dans le cluster 2 (phi-105-like), qui regroupe les phages Lc-Nu et phi AT3 infectant respectivement *Lb. rhamnosus* et *Lb. casei* (Tuohimaa *et al.*, 2006).

**Le module de la lyse** est quant à lui constitué du gène de l'endolysine et celui de la holine. L'action conjointe de ces deux protéines est essentielle pour la lyse cellulaire et la libération des particules virales néoformées (Wang *et al.*, 2000). Chez *O. oeni*, le mode d'action de l'endolysine a été caractérisé chez le phage fOg44 (São-José *et al.*, 2000). L'enzyme possède un peptide signal, dont le clivage permet son export dans le compartiment pariétal et l'activité lytique. Ce rôle est classiquement attribué à la holine dans le contexte de l'infection phagique. Le peptide signal est retrouvé au niveau de toutes les endolysines phagiques, sauf chez les prophages du groupe D, où la séquence est différente (résultats non montrés). On peut suggérer que la régulation de l'activité de l'endolysine chez les prophages du groupe D est différente de celui de fOg44, et des autres prophages.

**Le module distal** est hétérogène au sein du groupe D et chaque prophage possède ses gènes spécifiques (**Tab. XIV**). Néanmoins une **séquence cœur** codant quatre *orfs* est présente chez tous les prophages de type D analysés. L'un de ces *orfs* code une possible glycosyl-transférase, un acteur essentiel des voies de biosynthèse des polysaccharides bactériens (Coutinho *et al.*, 2003). La présence de glycosyl-transférase sur le génome de phages tempérés est considérée comme un mécanisme de protection pour la souche lysogène, *via* l'apparition d'un nouveau sérotype leurrant les phages (Markine-Goriaynoff, 2004). Par ailleurs ces enzymes participent à la synthèse de la paroi bactérienne et leur implication dans la réponse à différents stress extracellulaires (NaCl, éthanol) a été également suggérée chez *Bacillus subtilis* et chez *O. oeni* (Dols-Lafargue *et al.*, 2008; Inoue *et al.*, 2013).



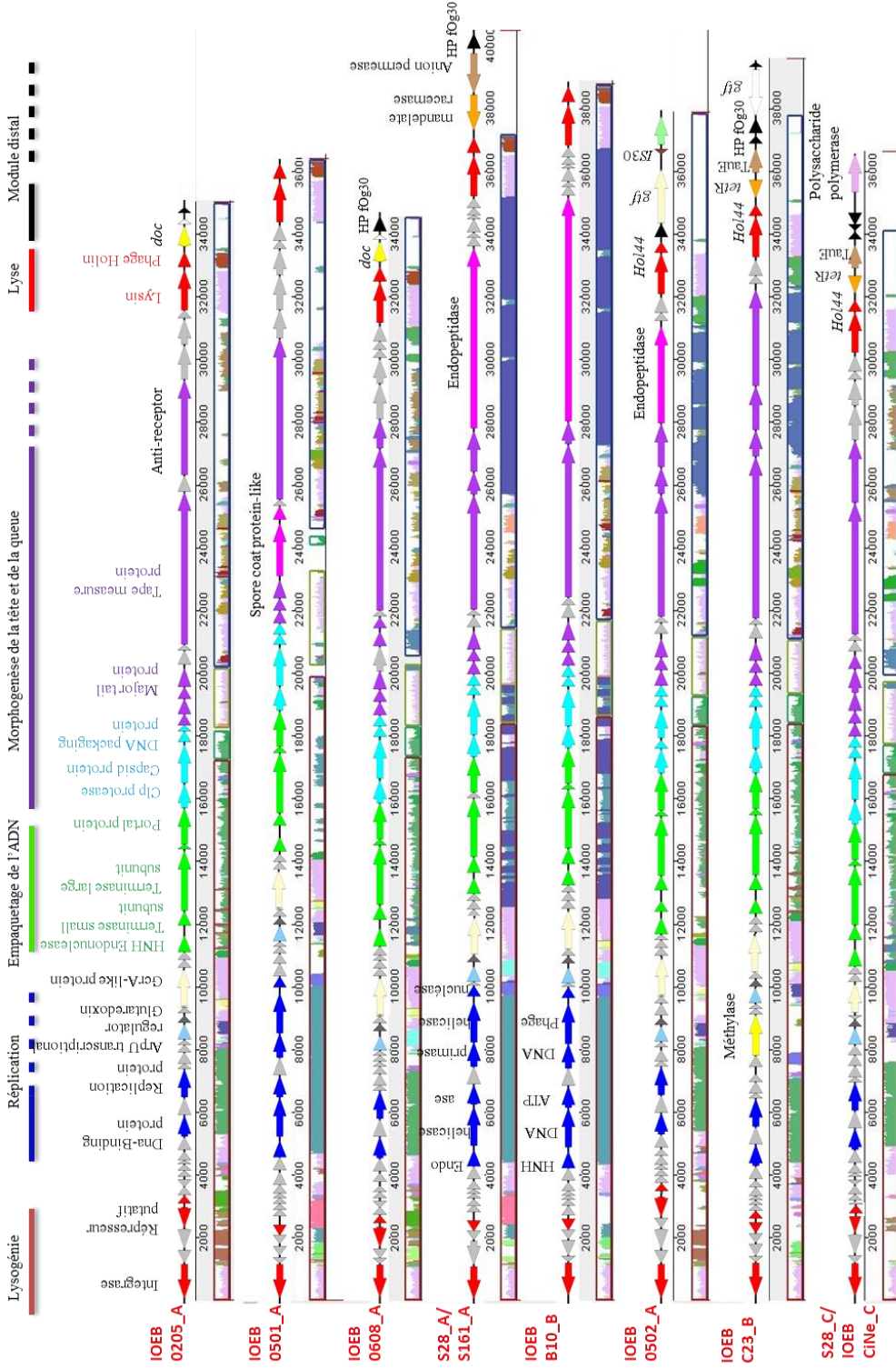
### 1.2.3. Gènes variables dans le groupe D

Trois zones variables au sein des génomes ont été analysées. Ces régions comportent 34 gènes (**Fig. 29**). Les protéines homologues identifiées par interrogation de la banque de données BlastP sont présentées dans le **tableau XIV**.

**La première région variable** est située entre le module de réplication et d’empaquetage de l’ADN. Chez le prophage IOEB 9805\_D, un gène code une protéine possédant un domaine homologue à une "ATP-binding cassette". Ces protéines sont impliquées dans le transport de nombreux composés (sucres, ions, peptides) à travers la membrane (Davidson & Chen, 2004). Un homologue est retrouvé chez *Lb. vini*, une espèce retrouvée dans le vin, mais qui est également un contaminant du procédé de production de bio-éthanol à partir de canne à sucre (Rodas *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2012). La même région du prophage chez la souche S13 contient un régulateur transcriptionnel putatif de la famille ArpU. Ce gène joue un rôle régulateur dans l’expression des gènes d’empaquetage de l’ADN et des fonctions de lyse (Quiles-Puchalt *et al.*, 2013). L’étude de  $\phi$ FL2A infectant *E. faecalis* a montré que l’induction du prophage mutant délété de ce gène ne montre aucune lyse de la bactérie, ni de libération de particules virales (Yasmin *et al.*, 2010).

**La seconde région variable** est localisée dans un gène associé à la protéine putative de spécificité de l’hôte. Par rapport aux autres prophages de type D, les prophages S11\_D, AWRIB418\_D et S13\_D possèdent un *orf* particulier, qui présente une délétion de 500 pb, mais dont le cadre de lecture est toutefois maintenu. Une telle délétion pourrait avoir un impact sur le spectre d’hôte de ces différents phages, mais cela reste encore à déterminer. L’analyse du gène "tail fiber" chez des mutants de spectre d’hôte du phage lytique OP de *Xanthomonas oryzae* a montré la présence de répétitions sur une portion du gène en 5’ terminal (Inoue *et al.*, 2006). La délétion de ces répétitions modifie le spectre d’hôte du phage.

**Le module distal** contient un certain nombre de gènes variables. Les deux prophages S11\_D et AWRIB418\_D contiennent un gène codant un système de restriction/modification (RM). Les systèmes ne présentent toutefois aucune identité protéique entre eux (**Fig. 29**). Les prophages IOEB 9805\_D et AWRIB576\_D, quant à eux, ont deux *orfs* communs (*orfs* 52/54 et *orfs* 53/55 respectivement). Ils sont associés à une protéine présentant une



**Figure 31. Génomique comparative des prophages du groupe A, B et C.** Alignement nucléotidique des prophages de type A, B et C inducibles et non inducibles testés lors de cette étude. Les gènes conservés entre différents prophages sont représentés par une même couleur. Les zones conservées en mauve sont conservées entre tous les prophages. L'organisation des prophages montrent six modules dont les délimitations sont indiquées par un code couleur: rouge/lysogénie/bleue-réplication de l'ADN/vert-empaquetage de l'ADN/violet-morphogénèse de la tête et de la queue/rouge-lyse/noir-module distal.

homologie (64 %) avec une protéine du phage de *Lactobacillus* A2 (l'*orf* est également associé à un gène de l'ilôt<sub>E</sub> intégré dans le site *attB<sub>E</sub>*). En général, nous avons observé peu de redondance entre les gènes retrouvés au niveau des ilôts et les prophages dans notre étude. Le produit déduit du second *orf* a une identité de 41 % (E-value 1e-25) avec un gène codant une protéine Sie-like chez *Lb. plantarum*. Le prophage AWRIB418\_D possède à la même position un *orf* codant une protéine Abi-like, homologue à la famille *AbiF* (COG4823) et présente chez *Lactococcus*.

### 1.3. Des modules variables chez les prophages A, B et C

#### 1.3.1. Généralités

L'organisation des génomes des groupes A, B et C et les homologies sont présentées sur la **figure 31**. Comme chez les prophages de type D, l'organisation modulaire est conservée. Cependant, les tailles des génomes sont plus petites (34,5 kb à 40,5 kb) et une structure mosaïque existe entre les différents prophages A, B et C, suggérant que des échanges de gènes ont eu lieu entre les différents oenophages.

#### 1.3.2. Module de la lysogénie

L'organisation conservée correspond à un ensemble de deux ou trois *orfs* séparant le gène de l'intégrase de celui du répresseur. Mais la région est extrêmement variable, les identités nucléotidiques/protéiques sont faibles entre les prophages. La recherche de domaine conservé ou d'homologue n'a pas permis d'assigner une fonction à ces *orfs* « centraux ». Le répresseur de type cl a été identifié pour chaque prophage grâce à la recherche d'homologies. Quelques prophages A et B partagent des identités plus fortes au niveau de cette séquence.

Cette région est dans certains cas suivie d'un petit *orf*, en orientation opposée. La protéine déduite a un motif de type HTH, et pourrait avoir le rôle du répresseur Cro chez le phage lambda. Cet *orf* à motif HTH est détecté chez les prophages IOEB 0205\_A, IOEB 0608\_A, IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B et IOEB CiNe\_C.

**Tableau XV. Identités nucléotidiques entre le module de réplication partiel associé aux six prophages IOEB 0205\_A, IOEB 0608\_A, IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B, S28\_C et IOEB CiNe\_C.**

	<b>IOEB 0205</b>	<b>IOEB C23</b>	<b>IOEB 0502</b>	<b>S28_C</b>	<b>IOEB 0608</b>
<b>IOEB 0205</b>	---	94.71	88.7	91.72	92.79
<b>IOEB C23</b>	94.72	---	90.57	95.2	93.14
<b>IOEB 0502</b>	88.68	90.54	---	90.05	90.78
<b>S28_C</b>	91.74	95.2	90.1	---	90.58
<b>IOEB 0608</b>	92.84	93.16	90.81	90.58	---

Le module de lysogénie chez de nombreux phages contient souvent un gène d'excisionase, un facteur directionnel de la RSS médiée par l'intégrase (Lewis & Hatfull, 2001). Aucun des prophages étudiés ne possède une excisionase identifiable. L'identification de cette dernière est d'ailleurs toujours difficile chez les phages.

### 1.3.3. Module de réplication de l'ADN

Le module de lysogénie est suivi d'une série de courts *orfs* (6 à 8). Aucune fonction n'a pu être attribuée aux protéines déduites.

La **région de réplication** comporte deux *orfs* codant un régulateur transcriptionnel putatif de la famille ArpU et une glutarédoxine. En aval, tous les prophages ont un *orf* particulier. La protéine déduite partage une identité de 31 % avec une protéine GcrA-like identifiée chez les phages J-1 et PL-1 de *Lb. paracasei* (Dieterle *et al.*, 2014). GcrA a été identifiée chez le phage Cbk de *Caulobacter crescentus*, et permet au phage d'altérer la réplication de son hôte (Gill *et al.*, 2012). L'*orf* correspondant est présent chez tous les phages de type A, B et C. Il existe également chez les phages de type D, mais la séquence protéique est moins conservée. Le prophage IOEB C23\_B est le seul à disposer d'un gène de méthyltransférase en aval du gène *gcrA*-like. L'utilisation de phages exprimant des méthyltransférases pourrait être utile au phage afin d'échapper à un système RM bactérien. Le choix de tels phages pourrait être réalisée en phagothérapie, ce qui potentialiserait l'efficacité du traitement (Murphy *et al.*, 2013).

Selon le phage, le gène *gcrA*-like est précédé de l'une ou l'autre des deux régions variables appelées R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>.

- La région R<sub>1</sub> est présente chez les prophages IOEB 0205\_A, IOEB 0608\_A, IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B, S28\_C et IOEB CiNe\_C et comporte cinq *orfs*. La région a une taille de 2,7 kb et toutes partagent une identité nucléotidique supérieure à 90 % (**Tab. XV**). L'interrogation des banques de données montre une homologie pour deux protéines déduites avec une protéine de liaison à l'ADN, et une protéine de réplication de l'ADN (**Fig. 31**).





- La région R<sub>2</sub> est présente chez les prophages IOEB 0501\_A, S28\_A et IOEB B10\_B. Elle est composée de sept *orfs* (**Fig. 31**). Le premier *orf* code une HNH endonucléase, une enzyme provoquant une cassure double brin de l'ADN au niveau de sites de coupures spécifiques (Wilson & Edgell, 2009). Les fonctions putatives associées aux autres gènes sont respectivement une hélicase, élément essentiel de la réplication de l'ADN de phage (Gauss *et al.*, 1994), une ATPase, une ADN primase requise pour l'initiation de la synthèse de l'ADN (Scherzinger *et al.*, 1977), une seconde hélicase et une autre endonucléase. Les HNH endonucléases ont été identifiées chez de nombreux bactériophages, dont les phages T4 et elles jouent un rôle d'élément mobile pouvant déplacer de grandes régions génomiques entre les génomes de différents phages (Belle *et al.*, 2002; Bonocora *et al.*, 2011). Leur présence suppose un transfert horizontal de cette région depuis un autre phage. Une structure homologue est retrouvée chez le phage phi JB (NC\_022775) de *Lb. delbrueckii*, une espèce présente dans le vin.

#### 1.3.4. Module d'empaquetage de l'ADN (TerS-TerL-Portal protein)

Les gènes majeurs impliqués dans l'encapsidation de l'ADN ont une organisation identique chez tous les prophages. Toutefois, l'identité nucléotidique reste inférieure à 30 % entre les phages au niveau de cette région. L'exception porte sur les prophages S28\_A et IOEB B10\_B, qui partagent plus de 90 % d'identité sur la région dédiée à l'empaquetage (**Fig. 31**). Le premier gène du module chez tous les prophages code une HNH nucléase putative, composante cruciale de l'empaquetage de l'ADN avec les deux sous-unités de la terminase (Kala *et al.*, 2014). Les protéines HNH, associées au module d'empaquetage de l'ADN, sont impliquées dans la morphogénèse de la tête, et servent de stimuli à l'activité endonucléase de TerL. Le gène codant la protéine portale est localisé en aval, à la suite d'un petit *orf* orphelin.

#### 1.3.5. Module de la morphogénèse de la tête et de la partie caudale

Le début du cluster est conservé chez tous les prophages. L'analyse des connectiques "head-neck-tail" à l'aide de la plateforme Virfam a permis d'identifier tous les gènes



impliqués dans la morphogenèse de la tête et de la partie caudale. De nouveau, malgré la synténie des gènes, les identités nucléotidiques et protéiques sont faibles (< 30 %).

La région en aval associée aux composants de la queue est également hétérogène (**Fig. 31**).

La longueur de la partie caudale chez les phages est proportionnelle à la taille du gène codant la protéine Tmp (Belcaid *et al.*, 2011). Chez *O. oeni*, les gènes *tmp* ont une taille variable : 5,1 kb (IOEB 0608\_A, IOEB C23\_B et IOEB 0501\_A) ; 4,8 kb (IOEB B10\_B et IOEB 0205\_A) ; 4,2 kb (S28\_C) ; 3,8 kb (IOEB 0502\_A) et 3,6 kb (S28\_A). Les protéines déduites ont des homologues associés aux prophages de *Lb. plantarum* (5,1 kb et 4,8 kb), *Lb. casei* (4,2 kb et 3,8 kb) et *Lc. lactis* (3,6 kb).

En aval du gène *tmp*, le prophage IOEB 0205\_A possède quatre *orfs* de fonction inconnue. Un cinquième *orf* code un peptide homologue à un anti-récepteur phagique. Les gènes présents aux mêmes positions chez les autres prophages ont été examinés. Un large *orf* de 5,7 kb codant une endopeptidase putative est présente chez les prophages S28\_A et IOEB B10\_B. Par ailleurs un gène de taille réduite (1,4 kb) codant une endopeptidase, est retrouvé chez IOEB 0502\_A et IOEB C23\_B. Aucune fonction putative n'a pu être attribuée aux *orfs* présents dans cette région chez les prophages IOEB 0608\_A, IOEB 0501\_A et S28\_C. Chez les phages Tuc2009 et TP901-1 de *Lc. lactis*, l'activité endopeptidase retrouvée au niveau de ce cluster de gènes est nécessaire pour hydrolyser la couche de peptidoglycane à la surface des cellules (Stockdale *et al.*, 2013). Cette stratégie permet d'augmenter l'efficacité de l'adsorption à la cellule hôte.

L'existence d'organisations géniques différentes chez les prophages dans cette région particulière suggère qu'il n'existe peut-être pas un seul type d'interaction entre les phages et les récepteurs phagiques sur la bactérie. Une étude sur les relations phages/hôte de 25 phages de *S. enterica* Serovar Typhimurium a montré la diversité des récepteurs utilisés (Shin *et al.*, 2012). Les phages ont été classés en trois groupes (F, B et L) selon les récepteurs bactériens utilisés (flagelle, protéine membranaire et O-antigène respectivement). Durant ce travail, les auteurs ont montré que non seulement les récepteurs utilisés par les phages sont différents mais qu'il existe des sous-groupes qui interagissent différemment avec le même récepteur. Chez les bactéries lactiques, la nature des récepteurs commence à révéler sa

**Tableau XVI. Contenu en orfs du module distal des prophages du groupe A, B et C.**

Prophage	Protéine			BestBlastHit (% id; e-value; % residue identity)
	Taille (bp)	GC %	Taille (aa)	
IOEB 0205_A	651	31,2	216	Death-on-curing family protein from <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> (WP_013231860.1 ): 58% id ; 2e-48 ; 108/137
	153	26,8	50	orpheline
	180	25,5	59	orpheline
IOEB 0608_A	651	31,3	216	Death-on-curing family protein from <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> (WP_013231860.1 ): 57% id ; 2e-47 ; 107/137
	153	26,8	50	orpheline
	489	28	162	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32678.1 ): 95% id ; 1e-97; 148/154
S28_A	1143	37,3	380	Mandelate racemase like from <i>Clostridium citroniae</i> (gb EHE98483.1 ): 61% id ; 2e-179 ; 296/380
	1275	36,6	424	Anion transporter from <i>Clostridium clostridioforme</i> CM201 (gb ENY95743.1 ): 59% id ; 1e-175 ; 331/422
	489	28,2	162	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32678.1 ): 95% id ; 2e-98 ; 149/154
IOEB 0502_A	435	22,1	144	orpheline
	1704	32,3	567	glycosyltransferase from <i>Pediococcus parvulus</i> (gb ACZ56367.1 ): 95% id ; 0 ; 554/567
	174	49,4	57	IS30 family transposase from <i>Lactobacillus paracasei</i> (gb EPC94828.1 ): 100% id ; 4e-31; 57/57
	906	26,4	301	HP from <i>Lactobacillus plantarum</i> 2165 (gb ERJ51178.1 ): 36 % id ; 9e-35 ; 157/289
IOEB C23_B	582	35,2	193	transcriptional repressor from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10709.1 ): 100% id ; 2e-138 ; 193/193
	759	37,4	252	permease TauE/SaFe from <i>Lactobacillus mali</i> ( WP_010078387.1 ): 56% id ; 1e-74 ; 185/254
	243	33,3	80	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOgPSU-1 (emb CAF32665.1 ): 94% id; 5e-47 ; 78/80
	477	28,5	158	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOg30 (emb CAF32678.1 ): 96% id ; 8e-100 ; 150/154
	1485	32,2	494	glycosyltransferase from <i>Lactobacillus</i> phage Lb338-1 (gb ACO37101.1 ): 43% id ; 2e-137 ; 313/496
	159	31,4	52	HP from <i>Lactobacillus helveticus</i> CIRM-BIA 953 (emb CDI43288.1 ): 51% id ; 8e-05 ; 32/41
S28_C/ IOEB CiNe_C	582	35,4	193	transcriptional repressor from <i>Oenococcus</i> phage fOg44 (gb AAD10709.1 ): 99% id ; 2e-137 ; 192/193
	759	37,4	252	permease TauE/SaFe from <i>Lactobacillus mali</i> ( WP_010078387.1 ): 56% id ; 1e-79 ; 185/254
	243	32,9	80	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOgPSU-1 (emb CAF32665.1 ): 96% id; 9e-48 ; 79/80
	204	24,5	67	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOgPSU-1 (emb CAF32666.1 ): 97% id ; 1e-19 ; 63/65
	396	28,3	131	HP from <i>Oenococcus</i> phage fOgPSU-1 (emb CAF32666.1 ): 100% id ; 4e-85 ; 128/128
	1209	29,2	402	polysaccharide polymerase from <i>Lactobacillus buchneri</i> (gb AFS01459.1 ): 43% id ; 1e-81 ; 221/350

complexité. Ils peuvent correspondre à des protéines membranaires, des composés polysaccharidiques, ou encore des acides teichoïques et lipoteichoïques associés au peptidoglycane (Mahony *et al.*, 2012).

### 1.3.6. Module de la lyse

Le module de la lyse est caractérisé par la présence des gènes de l'endolysine, et de la holine. Deux types de holine sont associés aux prophages. La première est nommée Hol<sub>44</sub>, et a été identifiée chez le phage fOg44 (Nascimento *et al.*, 2008). Elle est uniquement associée aux prophages non inductibles par la MC IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B et S28\_C.

Le second type de holine est la holine LLH. Historiquement, la protéine a été identifiée chez le phage  $\phi$ 10MC (Gindreau *et al.*, 1997). Elle est présente majoritairement chez les prophages de l'étude.

### 1.3.7. Module distal

**Les prophages IOEB 0501\_A et IOEB B10\_B ne possèdent pas module distal.**

Pour les autres prophages analysés, le module distal constitue une région hétérogène, comme cela a été observé pour le groupe D. Les fonctions protéiques attribuées à ces différents *orfs* sont présentées dans le **tableau XVI**.

**Les prophages IOEB 0608\_A et IOEB 0205\_A possèdent deux gènes codant une protéine doc ("death-on-curing") et une petite protéine hypothétique (60 aa).** L'identité nucléotidique entre les deux régions est de 100 %. Les deux protéines forment probablement un système toxine/anti-toxine, très répandu chez les éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages) des bactéries (Goeders & Van Melderen, 2014). Le système contribue au maintien de l'élément génétique P1 chez *E. coli*, en induisant le suicide des cellules curées du prophage, *via* l'action de la toxine doc (Garcia-Pino *et al.*, 2008). En présence du prophage, l'action de la toxine est inhibée par la production d'une protéine phd ("prevent host death").



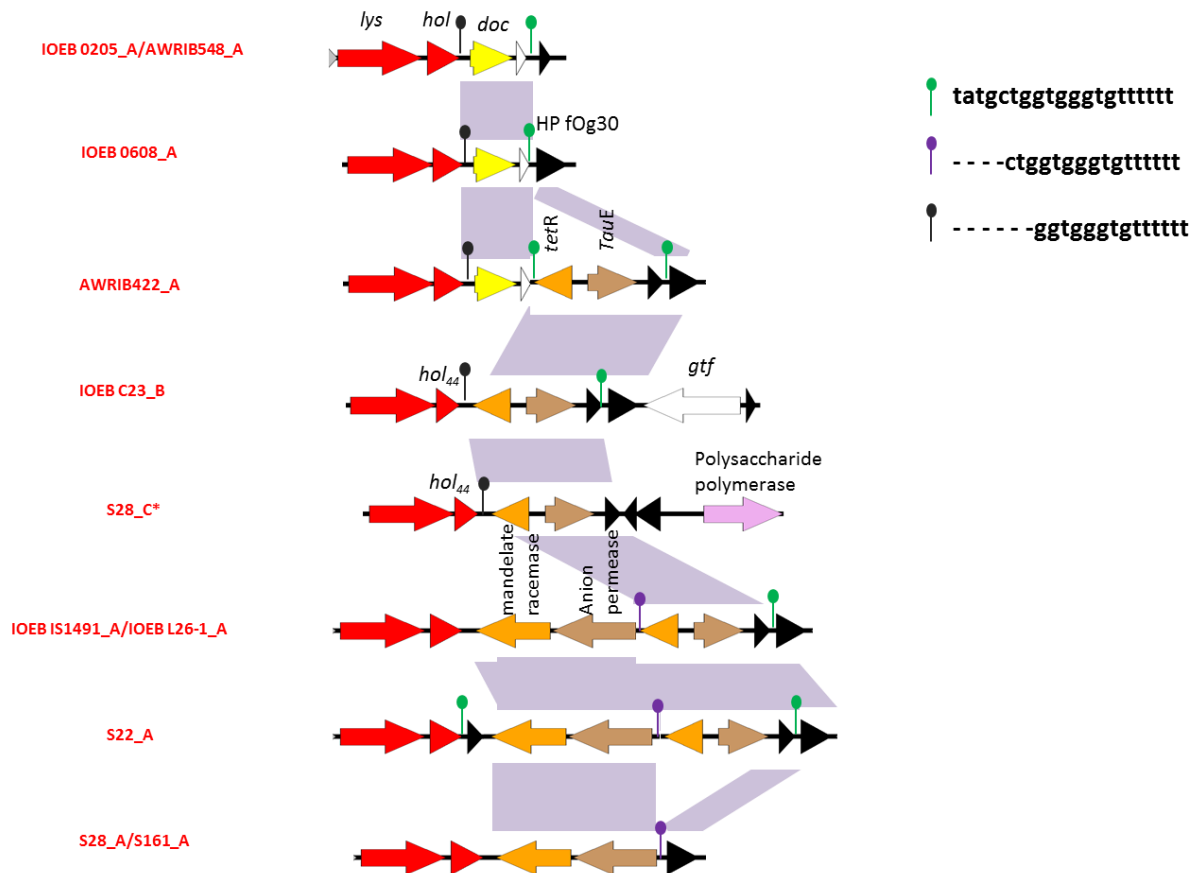
**Le module distal du prophage S28\_A** est constitué de trois gènes. Le premier code une mandélate racémase. Cette enzyme est responsable de l'interconversion des énantiomères de mandélate, un produit de la dégradation du styrène, présent dans les noyaux de fruits. Le second gène code une perméase putative, assurant la translocation du sodium et d'autres anions à travers la membrane. Le troisième gène du module code une protéine hypothétique, et est également présent dans le prophage de *O. oeni* IOEB 0608\_A.

**Les prophages défectifs IOEB 0502\_A, IOEB C23\_B et S28\_C** possèdent un module distal complexe. Chez IOEB 0502\_A, on retrouve quatre gènes, dont deux codant des fonctions inconnues. Les deux autres codent respectivement une glycosyl-transférase (Gtf) et un élément d'insertion IS30, considéré comme un médiateur de la diversité génétique chez *O. oeni* (El Gharniti *et al.*, 2012). Un gène *gtf* conservé est retrouvé chez *Pediococcus parvulus*, une bactérie du vin, et agent de la maladie du vin filant (Werning *et al.*, 2006). Il est aussi retrouvé chez *O. oeni*, au sein d'une autre région du chromosome (Dols-Lafargue *et al.*, 2008).

**Le module distal des prophages IOEB C23\_B et S28\_C** est constitué de six *orfs* dont trois sont communs. Ces dernières codent respectivement un régulateur transcriptionnel identifié chez le phage fOg44, une perméase putative de la famille TauE/SaFe et une protéine hypothétique du phage fOgPSU-1 (**Tab. XVI**). Les protéines TauE sont des transporteurs anioniques, impliqués dans l'export de sulfites au cours du métabolisme de la taurine chez certaines bactéries à Gram<sup>-</sup> (Weinitschke *et al.*, 2007). Le sulfite est un composant toujours présent dans le vin, et résulte d'un ajout par le viticulteur, soit d'une production endogène par les levures. La présence du prophage possédant ce gène donnerait un avantage sélectif à la souche. Le plasmide pOENI-1 qui a été caractérisé au sein de notre laboratoire code un homologue de cette protéine (Favier *et al.*, 2012). Cette étude a montré que ce gène est très répandu chez les levains malolactiques, et que les souches possédant le gène sont prédominantes durant les FML spontanées. Chez *O. oeni*, la présence de deux gènes codant une même fonction (*TauE*), et associés à deux types d'éléments mobiles (plasmide, prophage) suggère leur importance dans l'adaptation au milieu vin.

Dans le cas du prophage S28\_C, le module comporte un gène dont la protéine déduite a une homologie avec une polysaccharide polymérase, une protéine impliquée dans





**Figure 32. Comparaison du module distal des prophages A, B, et C.** L'alignement nucléotidique du module distal permet de mettre en évidence différentes combinaisons des *orfs*. Des séquences répétées de 20 pb, 16 pb et 14 pb sont retrouvées aux extrémités des régions échangées. (\*) Tous les prophages C possèdent une seule et unique configuration représentée par celle de S28.

la production d'exopolysaccharides. Les constituants membranaires dont les polysaccharides sont particulièrement déterminants dans la sensibilité aux phages. En effet, ils constituent à la fois un des points d'ancrage des phages (adsorption) et aussi la cible de l'endolysine phagique à la fin du cycle lytique (lyse) (Chapot-Chartier, 2014).

Chez IOEB C23\_B, les trois *orfs* restants codent deux protéines hypothétiques de fonctions inconnues et une glycosyl-transférase.

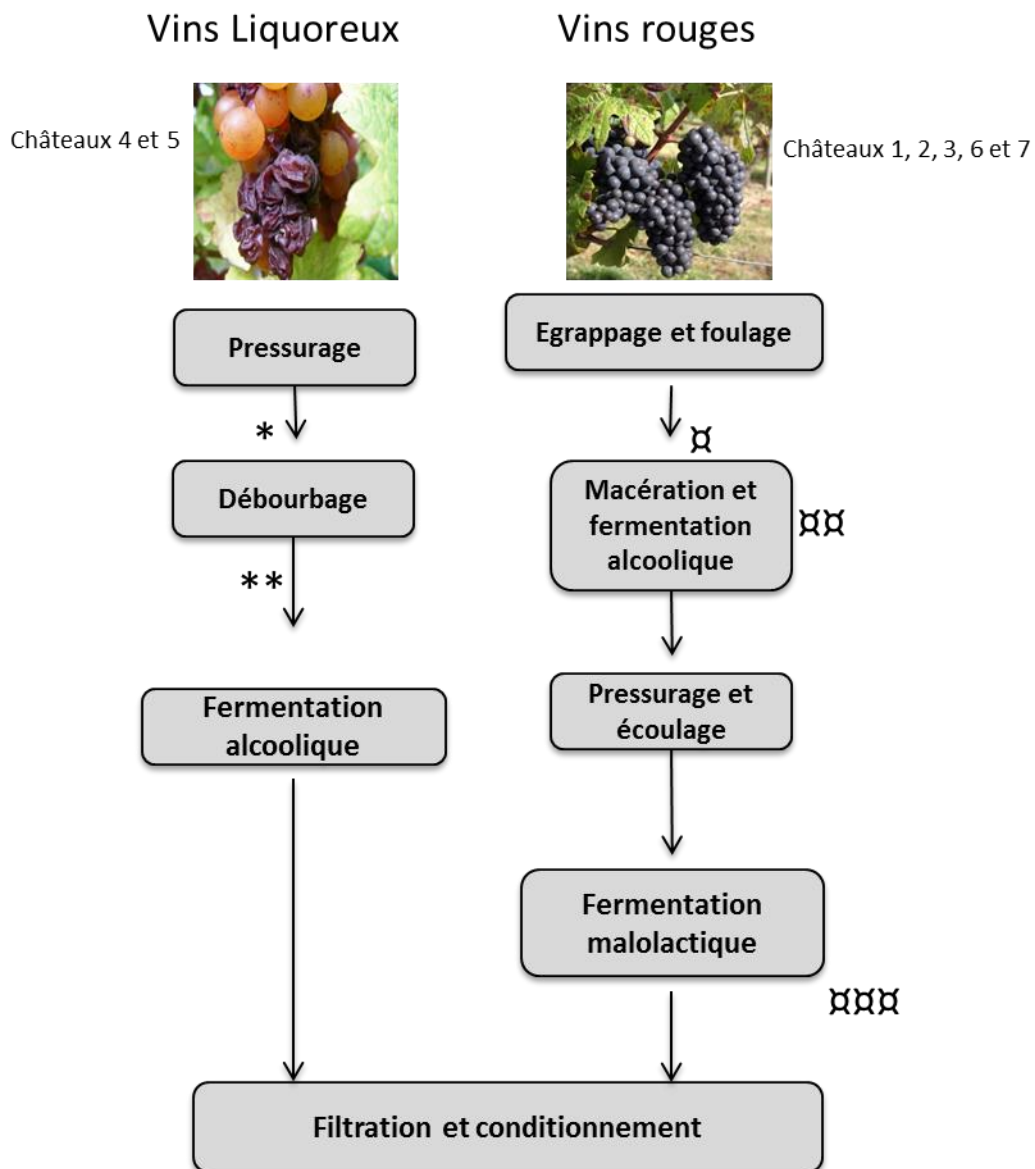
### 1.3.8. Echanges de gènes au niveau du module distal

L'analyse des autres prophages non testés phénotypiquement a montré que les différentes architectures citées précédemment sont représentatives de l'ensemble des prophages de cette étude. Les prophages AWRIB202\_B, AWRIB568/576\_A ne possèdent pas de module distal.

La comparaison des séquences des modules distaux des différents prophages est présentée (**Fig. 32**). Les modules se découpent en blocs, délimités par une courte séquence directe répétée de 20 pb. Ces séquences pourraient correspondre à des sites Chi dont la séquence chez *E. coli* est 5'-GCTGGTGG-3'. Ces sites stimulent la recombinaison *via* RecBCD chez *E. coli* (McKittrick & Smith, 1989). Ainsi, le module semble évoluer par accréation progressive de nouvelles séquences (**Fig. 32**).

## 2. Diversité des oenophages : l'apport du typage des phages du vin

Cette partie vise à évaluer si les phages isolés du vin ont des organisations similaires à celles trouvées chez les prophages ou bien si d'autres assortiments peuvent être trouvés. Nous avons analysé les phages isolés dans la campagne 2011, à partir d'échantillons de vins rouge de Pauillac, collectés en cours ou en fin de FML (Chapitre I, paragraphe 4). Nous avons également initié une seconde campagne, en choisissant des échantillons différents (origine, cépage, type de produit).



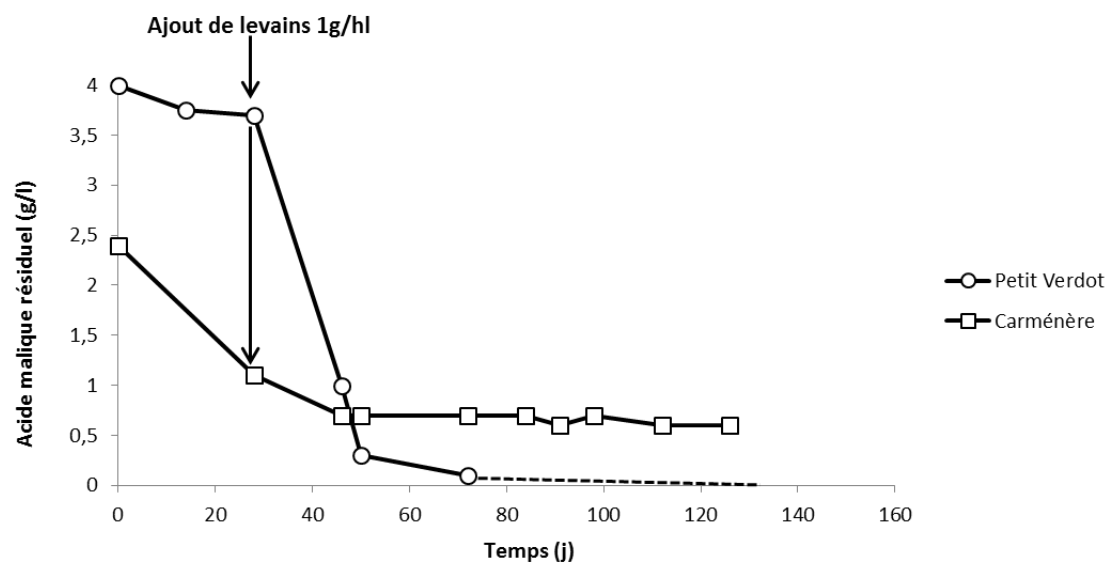
**Figure 33. Schéma simplifié des différents types de vinification effectués dans les sites de prélèvement.**

(\*) prélèvement de moût avant débourbage; (\*\*) prélèvement de moût après débourbage; (x) échantillon de moût à T=0; (xx) prélèvement pendant la FA; (xxx) prélèvement en cours de FML.

## 2.1. Les échantillons analysés en 2013

Notre recherche a été élargie à d'autres processus de vinification (blanc/rouge), et a privilégié différents cépages. Lorsque cela a été possible, la cinétique d'apparition des phages a été suivie depuis le stade de moût jusqu'à la fin de la FML. L'analyse a porté au total sur 39 échantillons. Des suivis cinétiques ont été réalisés dans trois châteaux (1, 2, 3) qui réalisaient des vinifications en rouge. Aucun défaut dans le déroulement de la FML dans ces sites ne nous a été signalé. Des moûts sulfités et non sulfités de vinification en rouge ont été analysés dans le château 6. Nous avons également analysé quelques vins blancs liquoreux, à partir de moûts collectés dans les châteaux 4 et 5. Dans le château 4, les moûts ont été collectés à partir de deux cépages différents (Sémillon et Sauvignon) avant et après débouillage. L'étape de débouillage consiste à laisser sédimenter le moût afin de ne récupérer que le jus clarifié en surface. Il est à noter que la production de vins liquoreux ne nécessite pas d'étape de FML. L'itinéraire technologique de ces procédés de vinification ainsi que les points de prélèvement sont résumés sur la **figure 33**.

Enfin, nous avons analysé deux échantillons au cours d'une vinification menée dans l'équipe de Génie des Procédés, sur raisins issus de cépages rouge, le Carménère et le Petit Verdot. Ces essais ont tous deux connu une FA normale. A l'issue de la FA, le vin issu du cépage Petit Verdot contenait une quantité relativement élevée d'acide malique (4 g/l), alors que le second (Carménère) présentait une quantité plus habituelle (2,4 g/l) (**Fig. 34**). La FML a donc débuté, comme le montre la baisse du taux d'acide malique mesurée durant les premiers jours. Après 28 jours de fermentation, un peu plus de la moitié de l'acide malique a été dégradé dans l'essai «Carménère» tandis que l'essai «Petit Verdot» contenait encore 3,7 g/l d'acide malique (**Fig. 34**). Un ensemencement curatif des deux vins par un levain malolactique (forme lyophilisée) a été alors réalisé à raison de 1 g/hl. Le levain S161, lysogène pour un phage de type A, a été choisi. Dans ces conditions, la FML de l'essai «Petit Verdot» a été achevée trois semaines après ensemencement. Le second vin a présenté un défaut de FML, et la quantité d'acide malique est restée constante (0,6 – 0,7 g/l) pendant plus de deux mois. Malgré l'ensemencement, la FML n'a pas été totalement achevée.



**Figure 34. Evolution de la FML dans deux essais réalisés à l'ISVV.**  
 Les essais ont été suivis dès la fin de FA par mesure de l'acide malique résiduel.

### 2.1.1. Concentrations en phages dans les échantillons

Les concentrations virales obtenues pour les deux stratégies adoptées sont présentées dans le **tableau XVII**.

**Dans les moûts de liquoreux**, on observe la présence de phages dans trois échantillons de moûts sur les six testés. Ils ont été prélevés dans les châteaux 4 et 5, et contiennent 10 UFP/ml, 80 UFP/ml et  $5,5 \times 10^3$  UFP/ml. De façon surprenante, les trois échantillons positifs en recherche directe ne montrent plus la présence de phages après amplification en MRS. Nous avons montré que la population de *O. oeni* a chuté dans l'échantillon durant son stockage au froid, et que d'autres bactéries sont devenues majoritaires. Il est probable qu'il s'agisse de bactéries acétiques, et que l'acidification du milieu ait inactivé les phages initialement présents.

**Les moûts collectés dans les châteaux 1, 2, 3, 6 et 7** (cépage rouge) ne contiennent pas de phages actifs en recherche directe. L'explication peut être le fait que les échantillons destinés à la recherche directe ont été centrifugés. Il est probable que les phages sont associés à des particules en suspension dans le moût et soient éliminés par la centrifugation. Ce même phénomène expliquerait le fait que le procédé de débouillage ait réduit au maximum la concentration de phages dans les échantillons de liquoreux. Il est à noter qu'un échantillon de moût du château 6 est positif uniquement après amplification, mais pas après sulfitage du moût. On peut expliquer cette observation par la sensibilité des phages/de la population lysogène aux sulfites.

Quelques phages ont été détectées dans deux échantillons de Merlot en milieu (Château 3/ T3) ou en fin (Château 2/ T5) de FML. Après amplification sur milieu MRS, des populations phagiques importantes sont observées. Le moment d'apparition est variable selon l'échantillon suivi: T1 (Château 2/ Cabernet Franc) ; T2 (Château 1) ; T4 (Château 2/ Merlot & Château 3/ Merlot). Les concentrations augmentent au cours de la FML, atteignant  $5 \times 10^8$  UFP/ml (Château 2/ Cabernet Franc).

**Concernant les deux essais locaux**, une recherche de phages a été réalisée à 140 jours dans l'essai « Carménère ». La recherche a été positive et des concentrations de  $2,2 \times 10^4$  UFP/ml et de  $5 \times 10^8$  UFP/ml ont été obtenues par recherche directe, ou après

**Tableau XVII. Recherche de phages sur le millésime 2013.**

	Cépages	Stade	Recherche directe	Recherche après amplification
<b>Château 1 (Vinification en rouge)</b>	CS	T0=moût	nd	nd
		T1	nd	nd
		T2	nd	3,48E+03 ufp/ml
		T3	nd	5,04E+03 ufp/ml
		T4=Fin FA	nd	5,3E+07 ufp/ml
<b>Château 2 (Vinification en rouge)</b>	CF	T0=moût	nd	nd
		T1	nd	2,63E+06 ufp/ml
		T2	nd	2,25E+06 ufp/ml
		T3	nd	1,22 E+08 ufp/ml
		T4	nd	1,39E+07 ufp/ml
		T5	nd	1,21E+07 ufp/ml
		T6	nd	3,00E+07 ufp/ml
		T7	nd	1,04E+07 ufp/ml
	T8	nd	2E+08 ufp/ml	
	M	T0=moût	nd	nd
		T1=75% FA	nd	nd
		T2	nd	nd
		T3	nd	nd
T4		nd	9,4E+04 ufp/ml	
T5	10 ufp/ml	6,7E+05 ufp/ml		
<b>Château 3 (Vinification en rouge)</b>	M	T0	nd	nd
		T1	nd	nd
		T2	nd	nd
		T3	10 ufp/ml	nd
		T4	nd	30 ufp/ml
		T5	nd	3,8E+06 ufp/ml
		Cuve différente	nd	1,5E+06 ufp/ml
		Mélange	nd	2,5E+06 ufp/ml
<b>Château 4 (Liquoreux)</b>	Sv	moût Av D_1	80 ufp/ml	nd
	Sm	moût Av D	5,5E+03 ufp/ml	nd
	Sv	moût Av D_2	nd	nd
	Sv	moût Ap D_2	nd	nd
<b>Château 5 (Liquoreux)</b>	Sm	moût	nd	nd
	Sm+Mu	moût	10 ufp/ml	nd
<b>Château 6 (Vinification en rouge)</b>	M	moût	nd	3,8E+03 ufp/ml
	M	moût sulfité (5g/hl)	nd	nd
<b>Château 7 (Vinification en rouge)</b>	CF	moût	nd	nd
	M	moût	nd	nd
<b>EA Œnologie (Hall Techno, vinification en rouge)</b>	C	mi-FML(Echec)	2,2E+04 ufp/ml	5E+08 ufp/ml

CS : Cabernet Sauvignon, CF : Cabernet Franc, M : Merlot, Sv : Sauvignon, Sm : Sémillon, Mu : Muscatelle, C : Carménère et P : Pauillac. nd : absence de phages de lyse.

amplification préalable, respectivement. Il s'agit des concentrations de phages obtenues les plus élevées durant cette étude.

### 2.1.2. Isolement des phages et premier typage sur base de la séquence *int*

Les deux campagnes ont permis d'isoler 40 phages présentant des morphotypes différents, 16 en 2011, et 24 retenus en 2013 (Tab. XVIII). Nous avons conservé les phages différents au sein d'un même échantillon de vin. Par contre, il est possible que des phages provenant de vins différents et ayant le même type d'intégrase, soient par la suite identiques.

Le typage des lysats a été mené par PCR. L'approche est délicate car les lysats de phages peuvent être contaminés par de l'ADN bactérien et ceci malgré leur centrifugation et filtration. La contamination est problématique dès lors que l'ADN génomique contaminant provient de souches lysogènes. Pour éliminer ces cas de faux-positifs, les lysats phagiques ont été dilués plusieurs fois en MRS, et un volume de 1  $\mu$ L contenant de 20 à 200 phages a été soumis à une PCR ciblant le gène bactérien *mle* (Oo1/Oo2, Tab. VI, matériels et méthodes). Les échantillons montrant l'absence d'amplicon ont ensuite été testés quant à la présence des quatre types d'intégrases. Nous avons considéré que la présence d'un type d'intégrase, et l'absence des trois autres séquences étaient un test supplémentaire de non contamination des lysats par de l'ADN génomique bactérien.

Le tableau XVIII montre des distributions proches en phages A et D. Cependant durant la campagne 2011, les phages D étaient plus nombreux que ceux de type A à partir de vins de Pauillac. C'est l'opposé en 2013. Le choix de cépages et de produits différents mène à un isolement majoritaire de phages de type A. Les phages B ont une distribution similaire lors des deux campagnes, et les phages C sont de nouveau très peu fréquents. Deux lysats répondaient à un mélange de deux types d'intégrases. Une intégrase de type C est associée à une intégrase de type A (Château 2, CF, T2) ou B (Ech. 36, Pauillac).

Comme au cours de la première campagne, les lysats répondant positivement à la PCR des phages de type C étaient des mélanges. Le phage C était associé à un phage de type



**Tableau XVIII. Diversité des phages isolés lors de la campagne 2011 et 2013.**

Château	Cépages	Hôte	Phages	Morphotype	A	B	C	D	
1	CS	IOEB 277	OE33CS1	C ++					
			OE33CS2	T +					
			OE33CS3	C +++					
			OE33CS4	T +					
2	CF	IOEB 277	OE33CF1	C +++					
			OE33CF2	C ++					
			OE33CF3	C +					
			OE33CF4	C +					
			OE33CF5	T +					
			OE33CF6	T +					
			OE33CF7	T +	*		*		
	M	IOEB 277	OE33MBv1	C ++					
			OE33MBv2	T +					
			OE33MBv3	T +					
3	M	IOEB 277	OE33MBc1	C +++					
			OE33MBc2	C ++					
			OE33MBc3	T ++					
			OE33MBc4	C ++					
			OE33MBc5	C +++					
6	M	IOEB 277	OE33MC1	C +					
4	Sv	IOEB 277	OE33SaG	C +++					
	Sm	IOEB 277	OE33SeG	C +++					
5	Sm+Mu	IOEB 277	OE33SM	C +++					
ND	C	IOEB 277	OE33XP	C +++					
ND	P	IOEB 277	φ19-277	C +++					
		S161	φ29-S161	T +					
			φ34-S161	C +++					
		S28	φ29-S28	C ++					
			φ34-S28	C ++					
			φ36-S28	C +					
			φ39-S28	C ++					
		S51	φ31-S51	T +					
			φ32-S51	T +					
			φ34-S51	C ++					
			φ35-S51	C ++					
			φ36-S51	T ++		*	*		
		S15	φ25b-S15	T ++					
		IOEB S450	φ36-450	T ++					
		S28	φ37-S28	C ++					
		S51	φ37-S51	T +					

\*mélange de phage C avec un type A ou un type B, CS : Cabernet Sauvignon, CF : Cabernet Franc, M : Merlot, Sv : Sauvignon, Sm : Sémillon, Mu : Muscatelle, C : Carménère et P : Pauillac.

A ou de type B, et sa purification n'a pas pu être obtenue. Ces résultats confirment que les oenophages de type C sont incapables d'initier un cycle lytique seul.

## 2.2. Diversité génétique des oenophages détectés

Le typage des phages a été réalisé sur les phages de type A et D. Les phages de type B ont été conservés, et restent à étudier.

### 2.2.1. Phages de type D

Nous avons noté que les phages de type D utilisent des sites d'attachement relativement longs (140 pb) pour réaliser la RSS. Afin de vérifier ces données qui ont été obtenues à partir des séquences *attB/attL* et *attR*, nous avons procédé au séquençage de la région contenant la séquence du site *attP* des oenophages libres de type D. Les résultats obtenus sont en accord avec nos résultats antérieurs et le site de RSS a bien une taille de 140 pb (Fig. 35).

La génomique comparative des prophages du groupe D a montré leur homogénéité. Cependant trois zones variables ont été identifiées. Elles ont été exploitées afin de typer les 12 nouveaux phages isolés. Des couples d'amorces ciblant la première région variable (entre les modules de réplication et d'empaquetage de l'ADN) ainsi que la seconde région (délétion de 500 pb du gène de "tail-host specificity") ont été dessinés. Des couples d'amorces supplémentaires ont été utilisés afin d'amplifier deux parties conservées dans le module distal : dans le gène *gtf* d'une part, et entre le gène de la holine et l'*orf* suivant, d'autre part).

Les résultats des réactions de PCRs obtenus montrent que tous les prophages isolés du vin sont du type S13\_D pour les deux premières régions variables, et possèdent tous la région conservée du module distal. Cependant les amplifications de la région variable du module distal sont négatives. Les phages isolés du vin présentent donc une configuration différente de celle des prophages de type D, au niveau de leur module distal.

Les profils de restriction de l'ADN issus de deux de ces phages, OE33SaG et OE33SM isolés de vinifications en blanc (Sauvignon et Sémillon) ont été comparés. Les deux phages ont donné de larges plages de lyse sur la souche sensible IOEB S277, et l'obtention de lysats

```

S13_D/S11_D      CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
PhageD_libre     CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
IOEB8417_attL    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
S11_attL         CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
S13_attL         CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
IOEB8417_attR    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTGTCGCTTA
S11_attR         CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTT--GCTTA
S13_attR         CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGATTA
IOEB0501_attB    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGATTGATA TAGAGCTTTT TTGTTGATTA
PSU-1_attB       CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTT--GCTTA
IOEB0205_attB    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTT--GCTTA
IOEB0607_attB    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTTTTCCTTA
IOEB0608_attB    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTT--GCTTA
IOEB9304_attB    CATCGCCCGC ATTTTAGCTC TATATCGACA AAGGT-GATA TAGAGCTTTT TTGTTGCTTA
*****          *****          *****          * * * * *          *****          * * * * *

                                     1 2                3,4,5

S13_D/S11_D      AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
PhageD_libre     AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB8417_attL    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
S11_attL         AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
S13_attL         AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB8417_attR    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
S11_attR         AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
S13_attR         AATGCCTTGA TATTATGTTT TCTAGATTTT TTTAAGTTAA TTTCTTAGGC TCTAATATAA
IOEB0501_attB    AATGCCTTGA TATTATGTTT TCTAGATTTT TTTAAGTTAA TTTCTTAGGC TCTAATATAA
PSU-1_attB       AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB0205_attB    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB0607_attB    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB0608_attB    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
IOEB9304_attB    AATGCCTTTG TATAGGTGTT TGTAGCTATG ATTAATGATC GCTAATCTTT TATTATTGTC
*****          * * * * *          *****          * * * * *          *****          * * * * *

                                     6 7                8                9

S13_D/S11_D      TATAAAAAC TGGCACACTT TG
PhageD_libre     TATAAAAAC TGGCACACTT TG
IOEB8417_attL    TATAAAAAC TGGCACACTT TG
S11_attL         TATAAAAAC TGGCACACTT TG
S13_attL         TATAAAAAC TGGCACACTT TG
IOEB8417_attR    TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
S11_attR         TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
S13_attR         CGTCTGCCTA TTTTAGTTCG CA
IOEB0501_attB    CGTCTGCCTA TTTTAGTTCG CA
PSU-1_attB       TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
IOEB0205_attB    TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
IOEB0607_attB    TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
IOEB0608_attB    TATAAAAAC TTA AAAACTT TG
IOEB9304_attB    TATAAAAAC TTGTTTAAATC AC
*****          * * * * *          * * * * *          * * * * *

                                     10/11, 12

```

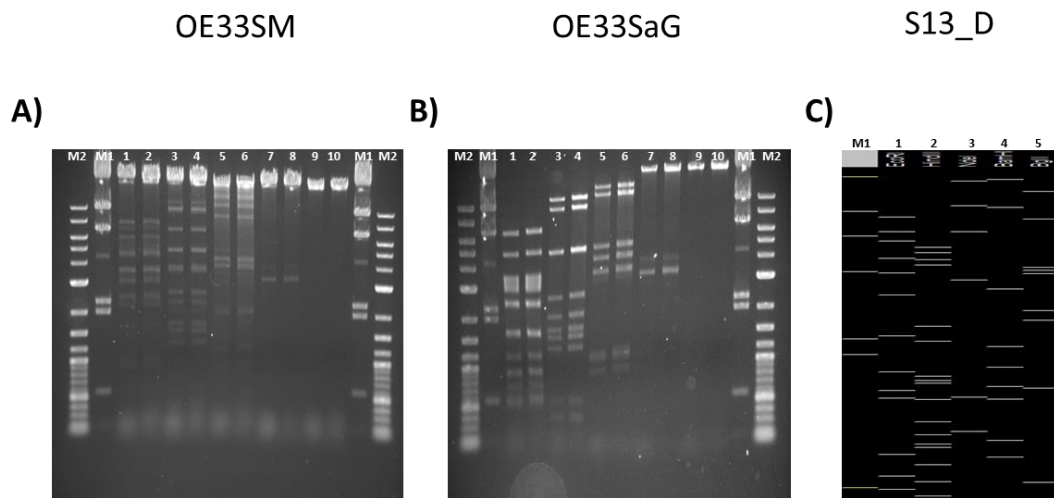
**Figure 35. Comparaison entre les séquences des sites *attR*, *attL*, *attB* et *attP* impliqués dans la RSS des prophages de type D chez *O. oeni*.** Les sites d'attachement (*attL* et *attR*) sont retrouvés chez les souches lysogènes et les sites d'attachement bactérien (*attB*) sont obtenus de souches non lysogènes. Les sites *attP* ont été amplifiés des phages isolés du vin et des phages induits. Les mutations ponctuelles sont numérotées de 1 à 12 et surlignées en gris. Les demi-sites non-homologues des séquences *attR* et *attB* présents chez les souches S13 et IOEB 0501 respectivement, sont indiqués en gras et en italique. Les 11 pb correspondant à l'extrémité 3' du tRNA<sup>Leu</sup> sont en rose.

concentrés a donc été relativement aisée. Les profils obtenus avec les enzymes *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, *BamHI* et *BglII* permettent de différencier distinctement les deux phages (**figure 36**). Les tailles des génomes de OE33SaG et OE33SM sont estimées à 37,5 kb  $\pm$  3,6 et 44,7 kb  $\pm$  3,6, respectivement. Le génome de OE33SaG est donc plus petit que la taille moyenne trouvée dans le groupe D. Les deux génomes ne possèdent pas de sites de coupure pour l'enzyme *BglII*, et génèrent trois fragments de tailles identiques avec *BamHI*. Sur ces bases, les profils de restriction du prophage du groupe D de la souche S13 ont été simulés *in-silico* et comparés à ceux des phages libres (**Fig. 36**). Les profils sont différents de ceux du prophage S13\_D. Enfin, la recherche d'extrémités cohésives a été négative. Ces résultats confirment que les phages du groupe D utilisent une stratégie d'empaquetage *pac*.

### 2.2.2. Typage des oenophages de type A

Les génomes des prophages de type A sont hétérologues. Nous avons mis au point un ensemble de réactions PCR permettant de typer rapidement les prophages de type A, selon les différentes configurations présentes dans leurs génomes. Pour cela, cinq modules du génome phagique ont été ciblés, et un gène ayant une fonction précise a été retenu dans chaque module. L'inventaire des différentes séquences nucléotidiques associées à chaque fonction a été réalisé chez tous les génomes de prophages de type A.

Le module de lysogénie est représenté par le répresseur. Trois gènes distincts codent une protéine ayant potentiellement cette fonction. Les trois couples d'amorces correspondants sont nommés C1/C2/C3. Dans le module de réplication, nous avons sélectionné deux couples ciblant les séquences codant deux protéines de réplication (Rep1/Rep2). On retrouve chez les prophages de type A, au niveau de leur module d'empaquetage, différentes séquences codant *terS*. Les couples TerS1/TerS2/TerS3/TerS4 ont été définis. Nous avons réalisé le même travail sur le gène codant la Tmp (couples Tmp1/Tmp2/Tmp3/Tmp4). Enfin, un couple supplémentaire cible la région du module distal, dans le gène *doc* présent chez certains phages de type A. L'utilisation de ces différents tests PCR permet de disposer d'un profil spécifique à chaque prophage de type A de notre panel.



**Figure 36. Profil de restriction de l'ADN génomique de phages de type D.** **A)** L'ADN du phage OE33SM digéré par *EcoRI* (piste 1 et 2); *HindIII* (piste 3 et 4); *NdeI* (piste 5 et 6); *BamHI* (piste 7 et 8); *BglII* (piste 9 et 10). Pistes 1, 3, 5, 7 et 9: non chauffés; pistes 2, 4, 6, 8 et 10: Fragments digérés et chauffés. **B)** L'ADN du phage OE33SaG digéré par *EcoRI* (piste 1 et 2); *HindIII* (piste 3 et 4); *NdeI* (piste 5 et 6); *BamHI* (piste 7 et 8); *BglII* (piste 9 et 10). Pistes 1, 3, 5, 7 et 9: non chauffés; pistes 2, 4, 6, 8 et 10: Fragments digérés et chauffés. **C)** Le profil de restriction virtuel du prophage de la souche S13 par *EcoRI* (piste 1); *HindIII* (piste 2); *NdeI* (piste 3); *BamHI* (piste 4) and *BglII* (piste 5). M1, ADN du phage  $\lambda$  digéré par *HindIII*; M2, 2-Log DNA ladder (Biolabs).

Les données présentées dans le **tableau XIX** suggèrent qu'une grande partie des phages isolés répond au même profil PCR, et que ce dernier correspond au profil des prophages des souches commerciales S28 et S161. On retrouve ces phages dans les échantillons provenant du château 1 (OE33CS1, OE33CS2), 2 (OE33CF3, OE33CF6, OE33MBv1, OE33MBv2) et 3 (OE33MBc3).

Nos données montrent également l'existence de combinaisons différentes et supplémentaires de phages A, qui n'existent pas dans les génomes des prophages analysés. Il s'agit des phages OE33MBc2, OE33MC1,  $\phi$ 34-S161 et  $\phi$ 36-S28. Le phage  $\phi$ 34-S161 est le seul à répondre positivement avec la PCR ciblant le gène putatif d'addiction *doc*. Nos résultats permettent de confirmer la présence de combinaisons des modules fonctionnels, autres que celles détectées *in-silico*. Il est possible que les phages isolés proviennent de l'induction de souches lysogènes qui faisaient partie de la flore autochtone lors des FML spontanées. Dans ce cas, ces souches lysogènes particulières auraient peut-être un avantage adaptatif. Ceci expliquerait que l'isolement de souches dans un but d'exploitation commerciale aboutisse aux mêmes types de lysogènes (type S28, S161).

Enfin, nous avons isolé des phages dans l'essai de micro-vinification ayant subi un échec de FML, ceci malgré l'inoculation du levain S161. Des particules virales induites de la souche S161 ont bien été retrouvées dans l'échantillon. Un autre phage (OE33XP) ne correspondant pas à celui du levain a été également isolé de ce vin. Le test de la résistance du levain à ce phage a montré une assez forte résistance ( $EOP = 2 \times 10^{-6}$ ). Il est important de noter que la recherche de phage dans ce vin a été faite à 140 jours alors que le ralentissement de la FML a commencé à partir de 28 jours pour stagner au 50<sup>ème</sup> jour.

### 3. Conclusion du Chapitre II

Les résultats rassemblés dans ce chapitre représentent la première étude de génomique comparative sur des génomes complets d'oénophages. A l'issue du chapitre I, les prophages de *O. oeni* pouvaient être classés en quatre groupes, selon la séquence de l'intégrase, et la nature du site utilisé pour la RSS. L'analyse des génomes dans leur totalité,

**Tableau XIX. Typage par PCR des oenophages de type A isolés du vin.**

	Module de lysogénie			Réplication de l'ADN		Empaquetage de l'ADN				Morphogénèse de la queue				Module distal
	C1	C2	C3	Rep1	Rep2	TerS1	TerS2	TerS3	Ters4	Tmp1	Tmp2	Tmp3	Tmp4	
<b>Prophages</b>														
IOEB 0608_A	■			■				■				■		■
IOEB 0205_A/Awrib 548	■			■		■				■				■
IOEB 0501_A		■			■	■				■				
S28_A/S161_A/S22_A		■			■		■				■			
0502_A			■	■					■				■	
Awrib422_A		■			■		■			■				■
Awrib568_A/IOEB L26-1_A		■			■	■					■			
<b>Phages du vin</b>														
OE33CS1		■			■		■				■			
OE33CS2		■			■		■				■			
OE33CF3		■			■		■				■			
OE33CF6		■			■		■				■			
OE33MBv1		■			■		■				■			
OE33MBv2		■			■		■				■			
OE33MBc2*	■			■			■				■			
OE33MBc3		■			■		■				■			
OE33MC1*		■		■		■					■			
OE33XP		■			■	■					■			
φ34-S161*	■			■			■				■			■
φ36-S28*	■			■			■				■			

\*Nouvelles combinaisons absentes chez les prophages de cette étude.

ainsi que le typage des phages isolés du vin montrent une situation beaucoup plus complexe, et une diversité qui était insoupçonnée. Le seul paramètre commun entre les groupes est l'organisation des modules.

Les groupes A, B et C sont caractérisés par une structure mosaïque. Le défaut dans l'induction des **prophages de type C**, couplé à l'impossibilité d'isoler des phages C purs suggèrent qu'il s'agit de prophages défectifs. Nous avons par ailleurs observé la forte prévalence des **phages du groupe B** dans le vin et dans le moût, et la rareté des prophages correspondants dans les génomes. D'autre part, ces phages génèrent souvent des plages claires sur leur hôte. La stabilité de la lysogénie serait donc moindre dans ce groupe. A ce jour, la littérature insiste sur le fait que les interactions phages/*O. oeni* existent essentiellement à travers la lysogénie. Si l'existence de phages purement lytiques est confirmée, leurs conséquences sur la vinification doivent être évaluées. **Les prophages du groupe D** forment un groupe homogène, distant des autres. Leur génome a une taille plus élevée. La recombinaison site-spécifique est particulière, du fait de la taille plus importante du site, de la séquence particulière de l'intégrase associée à la RSS, et enfin de la position géographique du lieu d'intégration. La lysogénie des prophages D est plus stable par ailleurs. Enfin, les analyses suggèrent que leur encapsidation ne se fait pas selon un mode « *cos* », ce qui est le cas des trois autres groupes.

L'analyse *in-silico* montre que les prophages offrent un répertoire de gènes bénéfiques à la bactérie après intégration. Il s'agit majoritairement de mécanismes de résistance aux phages (RM, Sie, Abi). Le prophage s'assure ainsi que l'hôte ne sera pas détruit par l'infection d'un phage surinfectant, et continuera à abriter et à reproduire son génome (Kobayashi, 2001). Paradoxalement, la présence de ces mécanismes de résistance est une preuve supplémentaire de la pression phagique rencontrée par *O. oeni* dans son environnement. Les prophages sont également susceptibles d'être bénéfiques à l'hôte en leur offrant des moyens de mieux résister aux contraintes (*gtf*, *tauE*). Ceci expliquerait pourquoi de nombreux levains malolactiques sont lysogènes. Les études seront poursuivies sur ces gènes particuliers, étant donné leur intérêt dans la sélection de levains. Les phages D pourraient avoir un rôle bénéfique particulier: leur lysogénie est stable et ils contiennent de nombreux gènes de résistance aux phages. Ceci pourrait signifier que la relation de *O. oeni* n'est peut-être pas la même avec tous ses bactériophages.





Une autre piste à explorer concerne la diversification des modules distaux des prophages A, B, C. Il sera intéressant de mieux comprendre l'accrétion successive des gènes à ce site, et son lien avec les fonctions de recombinaison de l'hôte, et/ou des phages. Ceci pourrait expliquer la plus grande homogénéité des phages D, opposée à la structure mosaïque des trois autres groupes.



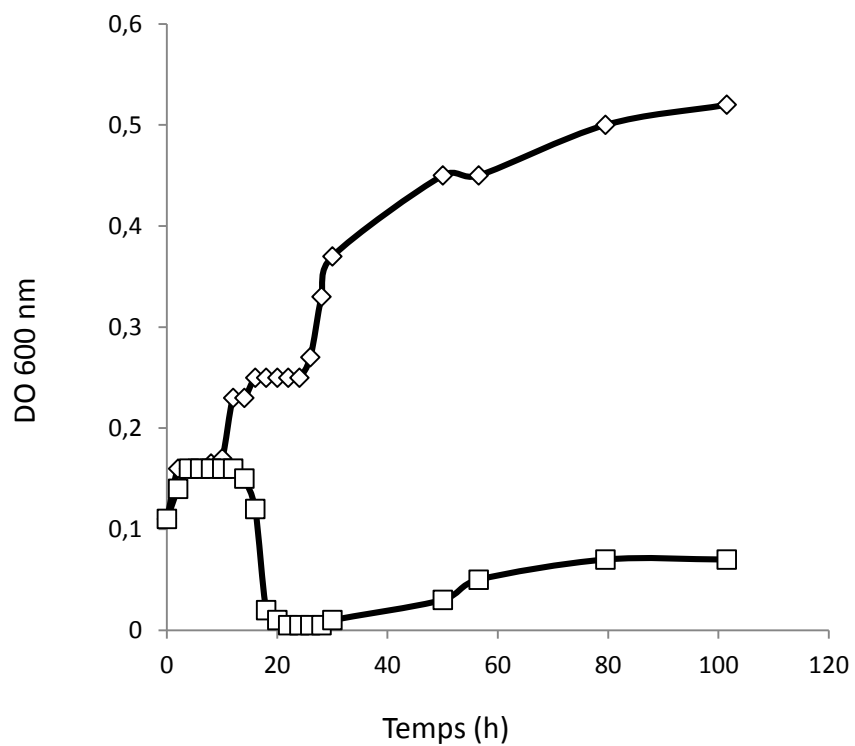
## **Chapitre III**

# **Multiplication et persistance des oenophages en conditions oenologiques**



A partir de 1976, Tomaso Sozzi a consacré plusieurs études à l'isolement et à l'observation des bactériophages infectant *O. oeni*. Ses travaux ont permis de corrélérer des incidents de FML à une forte concentration en phages dans les vins (Sozzi *et al.*, 1976; Cazelles & Gnaegi, 1982). Dans les années qui ont suivi, les liens existant entre la présence de phages, la réduction de la concentration en bactéries inoculées dans le vin, et le ralentissement ou l'arrêt de la FML ont été montrés expérimentalement (Sozzi *et al.*, 1982; Henick-Kling *et al.*, 1986). Cependant, le mécanisme à l'origine des fluctuations des populations virales et microbiennes dans ces expériences n'a pas été complètement élucidé. En effet, la chute de la population bactérienne peut être liée à une propagation lytique des phages dans le milieu (moût, vin) et/ou à l'induction des prophages. Ces deux phénomènes sont à même de modifier la flore indigène et d'avoir un impact sur les FML spontanées. Leur incidence est également une préoccupation pour les sélectionneurs de levains. En effet, le développement lytique de phages peut être redouté lors de la production et/ou de la stabilisation des levains. D'autre part, la sélection et la commercialisation de levains lysogènes par différentes sociétés posent le problème de l'induction possible des prophages lors de l'inoculation dans le vin, entraînant la lyse non désirée du levain. Le devenir des phages libérés dans le vin a été étudié par Gindreau (1998), qui a montré que les phages tempérés induits pouvaient lysogéniser avec succès des souches sensibles présentes dans le milieu.

L'analyse *in silico* des prophages réalisée dans les premiers chapitres suggère l'existence de relations complexes entre la bactérie *O. oeni* et son phage. La bactérie peut être détruite par le phage, mais l'établissement d'une relation comme la lysogénie peut aussi dans certains cas lui être bénéfique. Le risque « phage » est donc particulièrement difficile à appréhender, car les itinéraires technologiques dans les exploitations sont souvent complexes, et le comportement des phages vis-à-vis de leur hôte bactérien en conditions œnologiques reste peu connu. L'interaction phage-bactéries se fait dans un procédé particulier, au cours duquel la croissance bactérienne est modulée par de nombreux paramètres. On peut citer la nature et la concentration des substrats, notamment carbonés, l'apparition de contraintes physico-chimiques liées à la présence d'alcool, d'acides et autres composés inhibiteurs, ainsi que l'établissement d'interactions avec les levures. Dans ce contexte, le risque phage peut être lié (1) à l'instabilité éventuelle de la lysogénie au cours



**Figure 37. Cinétique de croissance de la souche lysogène IOEB 0608 en présence (□) et en absence (◇) de Mitomycine C.**

La souche a été cultivée en bouillon MRS jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0.2-0.3, séparée en deux aliquotes, dont l'une a été traitée à la mitomycine C.

de la vinification, (2) à l'aptitude des phages à se multiplier sur leur hôte dans un milieu relativement « agressif », et enfin (3) aux capacités des phages à persister sous un état infectieux dans l'environnement. Enfin, la diversité génétique observée chez les oenophages est un paramètre supplémentaire à prendre en compte, car elle doit évoquer l'existence d'une certaine plasticité phénotypique au sein des oenophages.

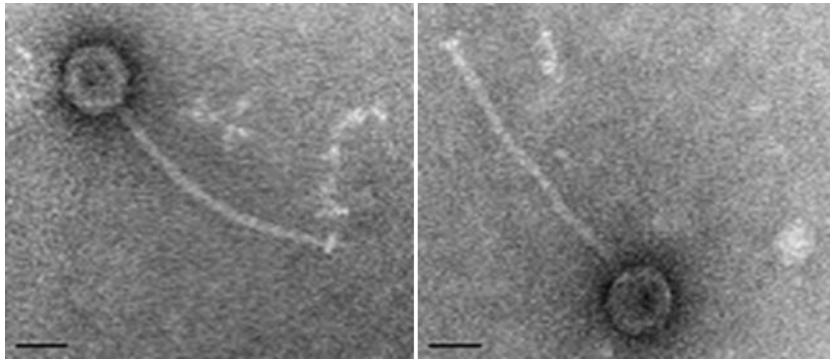
Dans ce chapitre, nous avons abordé l'impact de quelques paramètres influençant le développement de phages choisis au sein des groupes génétiques A, B et D, et nous avons caractérisé un phage lytique isolé de l'environnement œnologique. La partie suivante a eu pour objectif de préciser le potentiel de persistance des particules phagiques et le maintien de leur état infectieux en présence de contraintes associées au vin (présence d'éthanol, acidité...). Enfin, des essais d'induction des prophages lors de l'introduction des souches lysogènes correspondantes dans le vin ont été menés.

## 1. Multiplication des phages sur leur hôte

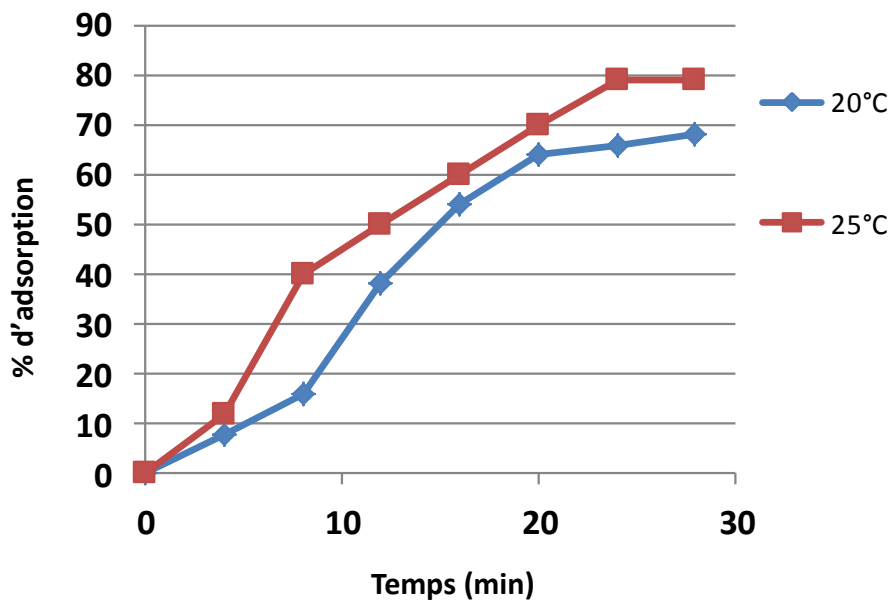
### 1.1. Impact de la température sur le choix lyse/lysogénie

Le suivi de la croissance des souches de *O. oeni* en conditions de laboratoire est habituellement réalisé aux températures de 25 °C ou de 30 °C. Cependant, des températures plus basses peuvent être trouvées dans les chais. Afin de favoriser la FML, l'œnologue peut intervenir en ajustant la température de l'enceinte du chai et/ou des cuves. La température moyenne dans le produit en cours de fermentation ne doit pas excéder 20 °C à 25 °C. Cette différence entre les températures appliquées pour la propagation de *O. oeni* au laboratoire et en conditions œnologiques nous a amené à comparer le développement d'un phage tempéré à 20 °C et à 25 °C. Nous avons retenu le phage tempéré  $\phi 0608MC$ , obtenu après induction à la MC de la souche lysogène IOEB 0608 (**Fig. 37**). Le phage est classé dans le groupe A, qui est l'un des deux groupes largement représentés dans notre panel de bactériophages. Le phage  $\phi 0608MC$  a ensuite été propagé sur la souche permissive et non lysogène IOEB S277 dans le but de disposer d'un stock concentré. L'observation des





**Figure 38. Observation en microscopie électronique des particules de φ0608MC** (Denise Tremblay, Centre de Microscopie de l'U. Laval, Québec).  
La barre représente 100 nm.



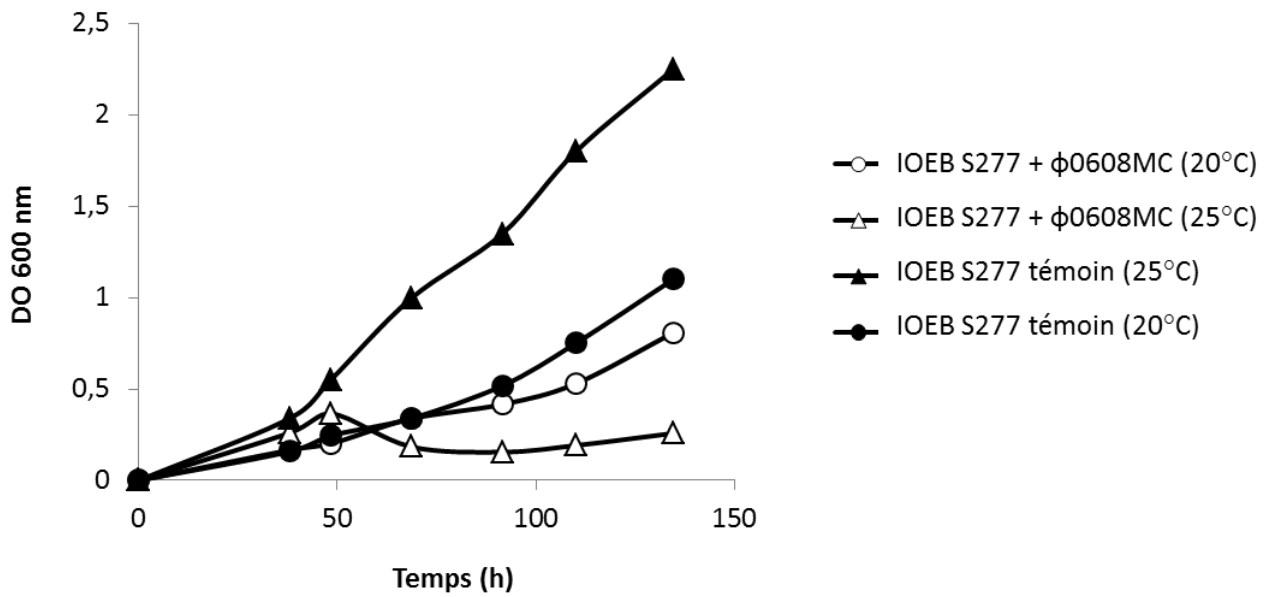
**Figure 39. Taux d'adsorption de φ0608MC sur son hôte *O. oeni* IOEB 0608 à 20 °C ou à 25 °C.**

particules en microscopie électronique montre la morphologie habituelle associée aux oenophages, et leur appartenance à la famille des *Siphoviridae* (Arendt & Hammes, 1992; Cazelles & Gnaegi, 1982; Davis *et al.*, 1985; Nel *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1996; Sozzi, *et al.*, 1982) (**Fig. 38**).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de la température sur la première phase du cycle infectieux qui est l'adsorption. Les phages et les bactéries ont été mis en contact en milieu MRS $\phi$  à 25 °C, à raison d'une MOI de 0,0001 (1 phage pour 10000 bactéries). Les résultats sont présentés sur la **figure 39**. Dans les conditions suivies, environ 80 % des particules se sont absorbées sur les cellules hôtes après 30 minutes de contact. Un taux légèrement inférieur de 70 % a été mesuré à 20 °C au cours de la période analysée.

Dans l'expérience suivante, nous avons souhaité mesurer l'impact de la température post-adsorption. Nous avons donc reproduit les conditions d'adsorption à 25 °C, en prolongeant l'étape à 60 minutes. Les cellules infectées ont été collectées par centrifugation et mises en suspension dans un volume de milieu frais. Ce volume a été divisé en deux, et les essais ont été incubés à 20 °C ou à 25 °C (**Fig. 40**). A 25 °C, nous avons observé un délai dans la croissance de l'essai infecté, par rapport à la culture témoin non infectée, traduisant l'infection virale. La lyse est apparue après 50 h et une concentration finale en phage de  $4.2 \times 10^8$  UFP/ml a été mesurée après 140 h. Les deux essais incubés à 20 °C ont montré une croissance similaire dans les premières 90 h. Aucune lyse n'a été observée dans l'essai infecté, et la densité optique est toutefois restée inférieure à celle du témoin non infecté. Après 140 h, la culture infectée incubée à 20 °C contenait 10 fois moins de phages ( $1.1 \times 10^7$  UFP/ml) que l'essai infecté incubé à 25 °C.

Ces observations vont dans le sens d'une décision favorable à la lysogénie à 20 °C, et au cycle lytique à 25 °C. Ceci a été observé chez de nombreux phages, comme le bactériophage  $\lambda$ . Lors d'une croissance bactérienne rapide, il est classique d'observer une orientation du phage vers un cycle lytique. Une réduction de température peut agir sur la régulation lyse-lysogénie. Elle peut également impacter d'autres étapes critiques du cycle viral, comme l'encapsidation par exemple. Chez le phage 1358 infectant *Lc. lactis*, les valeurs de burst size varient sensiblement selon la température (Dupuis & Moineau, 2010).



**Figure 40. Effets de la température sur la production virale de φ0608MC sur son hôte *O. oeni* IOEB S277 post-adsorption.**

Les cellules ont été infectées avec le phage φ0608MC à une MOI de 0.001. Après 60 min d'adsorption à 25°C, les cellules ont été collectées par centrifugation, remises en suspension en bouillon MRSφ et incubées à 20°C ou 25°C. La croissance a été suivie pendant 140 heures par mesure de densité optique, et la concentration finale en phage a été mesurée par la technique de double-couche à 140 heures.

## 1.2. L'adsorption des œnophages est variable selon le milieu

Le phage  $\phi$ 34-S51 (type D) a été mis en contact de cellules de *O. oeni* IOEB S277 dans trois milieux différents : MRS, milieu au jus de raisin et enfin un échantillon de vin rouge (Fig. 41). La concentration résiduelle a été mesurée au cours du temps afin de déterminer le pourcentage d'adsorption aux cellules. Il a été vérifié que le phage ne subissait pas d'inactivation dans le milieu au cours de l'expérience.

En milieu MRS, l'adsorption est rapide et un taux de 80 % est obtenu pour le phage  $\phi$ 34-S51 dès 20 minutes. Ces résultats sont proches de ceux observés précédemment pour  $\phi$ 0608MC. L'adsorption du phage est observée dans les deux milieux « jus de raisin » et « vin », mais elle est moins importante sur la durée de l'observation (20 % et 40 % après 20 minutes de contact, respectivement). Nous n'avons pas prolongé l'expérience au-delà de 20 minutes. Il ne nous est pas possible de savoir si l'adsorption est limitée en conditions œnologiques (par exemple par la présence de particules compétitrices). Ceci se traduirait par un taux non optimal restant constant dans le temps. L'autre possibilité est que l'adsorption soit plus lente en conditions œnologiques et parvienne à une valeur optimale en un temps plus long.

L'élément important à retenir de cette expérience est que la première étape du cycle infectieux, à savoir l'adsorption, a lieu en milieu jus de raisin et en milieu vin à 25 °C.

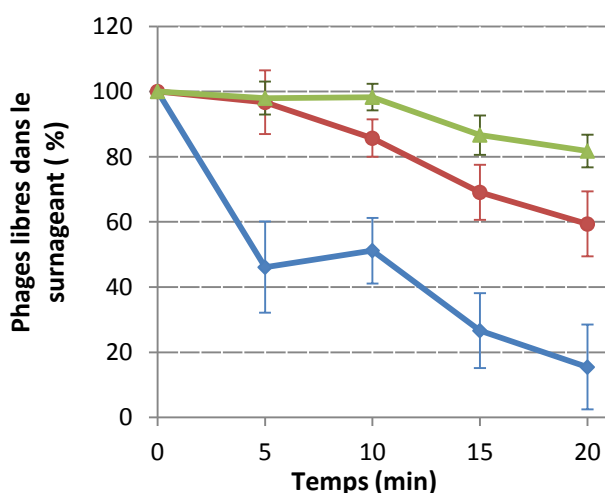
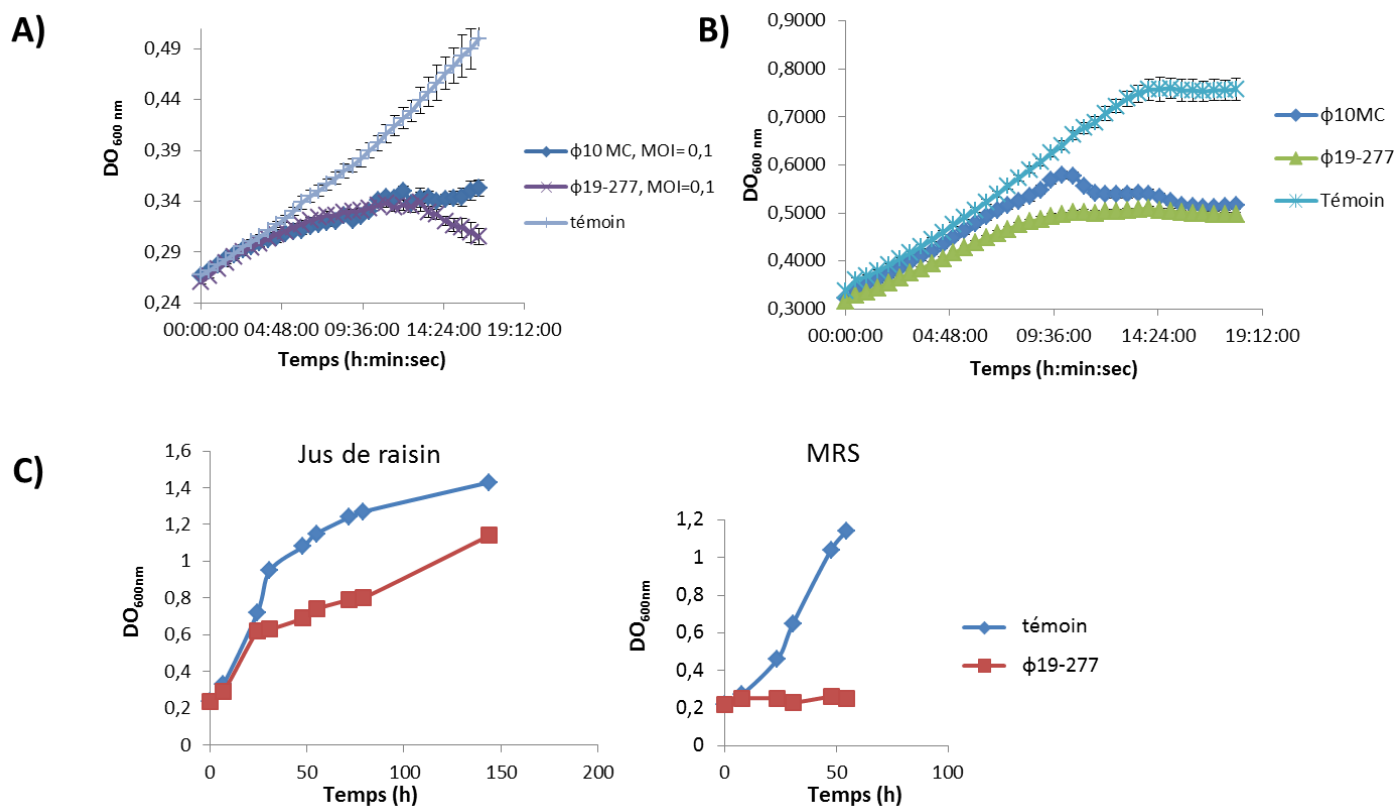


Figure 41. Modalités d'adsorption du phage  $\phi$ 34-S51 sur la souche hôte *O. oeni* IOEB S277 en milieu MRS (◆), en milieu au jus de raisin (▲) ou en vin rouge (●). Les essais ont été réalisés à 25 °C et représentent les valeurs moyennes de trois essais indépendants.



**Figure 42. Infection de *O. oeni* par des bactériophages dans différents milieux.**

L'infection de IOEB S277 par deux phages différents a été réalisée en bouillon MRS (A) et dans un milieu utilisé pour la production de levains (B). Les infections ont été réalisées en présence d'une MOI de 0,1 en microplaque. Le phage  $\phi 19\text{-277}$  a été également inoculé dans une culture de *O. oeni* IOEB S277 réalisée en milieu Jus de raisin ou en MRS (C).

### 1.3. Déroulement du cycle infectieux dans différents milieux.

Des essais d'infection en présence d'une MOI de 0,1 ont été réalisés dans du MRS ainsi que dans un milieu utilisé dans l'industrie pour produire les levains malolactiques commerciaux (**Fig. 42 A & B**). Nos résultats démontrent une lyse significative et rapide des cultures infectées par deux phages différents par rapport au témoin non infecté. Le milieu utilisé pour produire les levains commerciaux est donc favorable à la propagation des oenophages (**Fig. 42 B**).

Nous avons également comparé l'aptitude des phages à infecter leurs cellules hôtes dans le MRS et dans le jus de raisin (**Fig. 42 C**). Une culture a été inoculée dans les deux milieux et les infections ont été initiées avec les mêmes MOI. Dans ces conditions, une lyse rapide est observée en MRS. Bien que le phage utilisé soit lytique (paragraphe 2), la lyse n'est pas visible en jus de raisin, et la multiplication des phages produit un ralentissement, qui est net à partir de 25 h de culture. La plus grande difficulté du phage à lyser la culture est à rapprocher de nos observations réalisées lors des tests d'adsorption. En jus de raisin, l'étape d'adsorption est ralentie/réduite. Il est possible que des molécules en suspension soient compétitrices vis-à-vis des particules virales. L'infection par le phage a donc lieu en milieu au jus de raisin, même si la croissance bactérienne est moins affectée que lorsque l'infection se déroule en MRS.

### 1.4. Effets des composés polyphénoliques sur la multiplication du phage $\phi$ 19-277 en milieu MRS

Parmi les molécules présentes dans le vin, les composés polyphénoliques sont connus pour leur action inhibitrice vis-à-vis de plusieurs virus infectant des cellules eucaryotes. C'est le cas notamment du resvératrol (Matias *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2011). L'action virucide de quelques molécules s'exerce également vis-à-vis de virus de bactéries. Selon Henick-Kling *et al.* (1986), l'acide caféique pourrait inactiver les oenophages. Le resvératrol en présence de cuivre limite le développement des coliphages lambda (ADN db) (Ahmad *et al.*, 2000), MS2 (ARN sb) et phiX-174 (ADN sb). La catéchine quant à elle inhibe la formation de plages de lyse chez le phage PL-1 (ADN db) infectant la bactérie lactique *Lactobacillus casei* (Lee *et al.*,

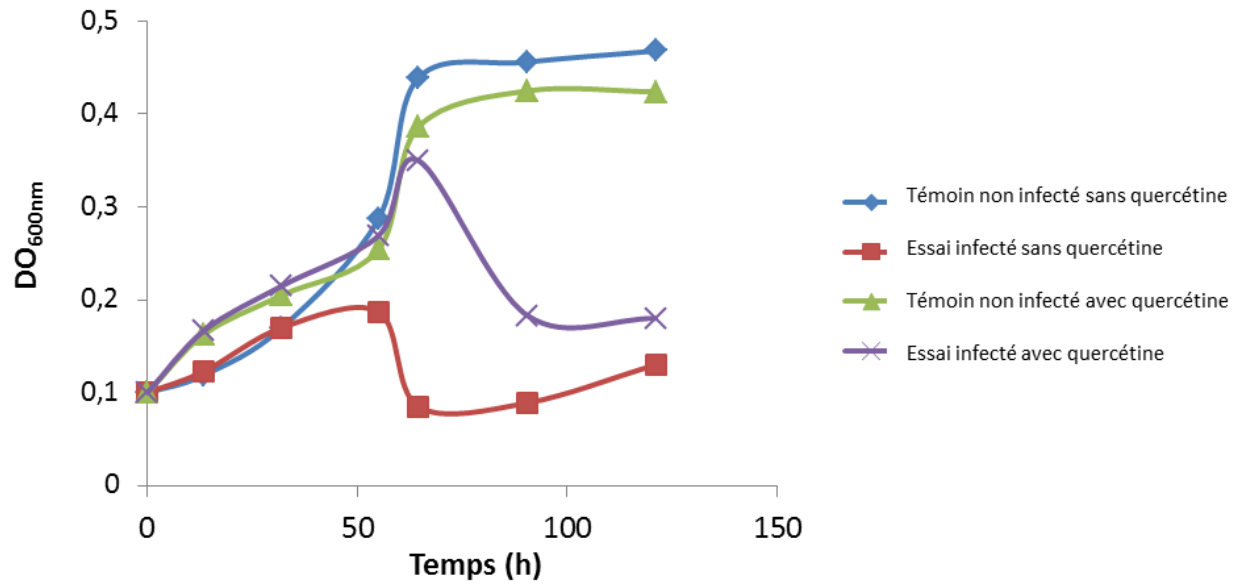


Figure 43. Infection de *O. oeni* IOEB S277 par le phage  $\phi$ 19-277 en présence ou en absence de quercétine (100  $\mu$ g/ml).

1985). Ces travaux permettent d'envisager une action directe des polyphénols sur les particules (aspect virucide), et/ou une action indirecte par modulation de la physiologie de l'hôte bactérien, modifiant ainsi le cycle lytique et/ou lysogénique du virus. Il est établi que des composés phénoliques interfèrent avec la croissance de *O. oeni* (Galindo *et al.*, 2011; García-Ruiz *et al.*, 2011). Le lien éventuel entre la présence de polyphénols et la stabilité de la lysogénie n'a pas été évalué dans ces deux dernières études.

Grâce à une collaboration avec le Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique situé à l'ISVV (Dr Stéphanie Cluzet), nous avons initié l'étude de l'impact des polyphénols du vin sur l'activité lytique des oenophages. L'étude préliminaire a porté sur trois molécules: le resvératrol, la catéchine et enfin la quercétine. Nous avons suivi le déroulement de la croissance de la souche *O. oeni* IOEB S277 infectée ou non par le phage  $\phi$ 19-277, en présence ou non du composé phénolique (des concentrations proches de celles trouvées dans les vins ont été retenues).

Aucun effet n'a été observé pour le resvératrol et la catéchine (résultats non montrés). Les essais obtenus en présence de quercétine sont présentés dans la **figure 43**. Les résultats présentés reflètent la tendance observée lors de plusieurs essais indépendants. En absence de quercétine, l'ajout de phages à la culture bactérienne (MOI = 0,01) provoque une lyse de la culture à partir de 55 h. L'infection virale est donc efficace. En présence de quercétine (100  $\mu$ g/ml), la croissance du témoin non infecté est identique à celle du témoin sans quercétine. Lorsque le phage est ajouté, la croissance de la bactérie est observée jusqu'à 64 h, et la lyse intervient seulement à ce moment. Une estimation de la concentration finale en virus a montré une réduction d'un facteur 10 en présence de quercétine. Les résultats suggèrent donc que la quercétine retarde et/ou limite le développement viral. Les expériences ont été reproduites en remplaçant la quercétine par des fractions de composés phénoliques obtenues après fractionnement d'un vin rouge par chromatographie de partage centrifuge. L'une des fractions a donné des résultats identiques. Son analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) a permis d'identifier la présence de resvératrol, de quercétine et de myricétine (un analogue de la quercétine) dans la fraction (résultats non montrés).





Nous avons vérifié que la quercétine n'altère pas la stabilité du phage. Une suspension du phage  $\phi$ 19-277 a été incubée en présence de la molécule pendant 60 h. Aucune chute de concentration n'a été observée. Le phénomène d'inhibition du cycle viral par la quercétine que nous avons observé précédemment n'est donc pas lié à une inactivation du virus, le rendant incapable de s'adsorber sur la paroi bactérienne. La cible de la quercétine pourrait donc être l'hôte bactérien, *via* par exemple une modification de l'enveloppe limitant la fixation des phages. D'autres hypothèses sont possibles car les nombreux effets biologiques de la quercétine s'exercent *via* différents mécanismes : activités anti-oxidante et chélatrice de métaux, action sur différentes pompes membranaires dédiées à l'efflux de toxiques (Martinez *et al.*, 2009), ou encore modulation de l'expression génique et de la réparation de l'ADN (Nijveldt *et al.*, 2001). Selon Celik & Arinç (2010), la quercétine protègerait des dommages à l'ADN induits par la mitomycine C. Dans ce contexte, nos travaux seront poursuivis afin de caractériser l'effet de la molécule non seulement sur le cycle lytique des oenophages mais également sur la stabilité de la lysogénie.

## 1.5. Conclusion

L'infection de *O. oeni* par ses bactériophages est possible dans le jus de raisin. Néanmoins, l'adsorption semble non optimale dans ce milieu par rapport à celle observée en milieu de laboratoire. Nos essais suggèrent par ailleurs (i) l'interférence de certains composés phénoliques dans la relation phage-hôte et (ii) l'effet exercé par la température sur la décision lyse/lysogénie. Quelques tentatives ont été réalisées dans le but de réaliser une infection en milieu vin. Un vin-modèle a été préparé par fermentation alcoolique d'un jus de raisin commercial en présence de levures. Nous avons eu des difficultés à obtenir une croissance suffisante de *O. oeni* dans le milieu, rendant les résultats difficilement exploitables. La capacité des oenophages à infecter *O. oeni* selon un cycle lytique dans le vin n'a pas été démontrée. Si elle est possible, elle dépend de facteurs complexes liés au phage, à sa concentration, et à sa persistance vis-à-vis des paramètres du vin. La réussite de l'expérience dépendait de l'adaptation des cellules de *O. oeni* au milieu vin. C'est l'étape critique, et l'obtention d'une croissance en condition d'inoculation au chai nécessite une

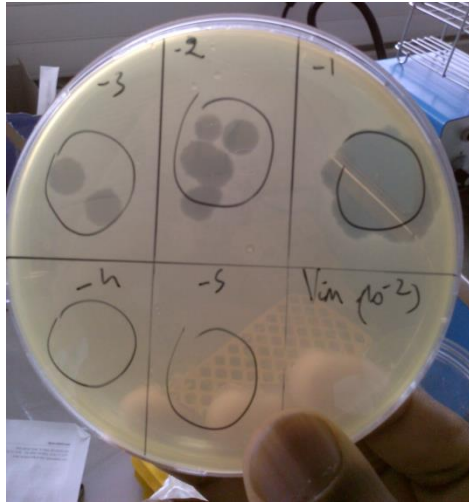


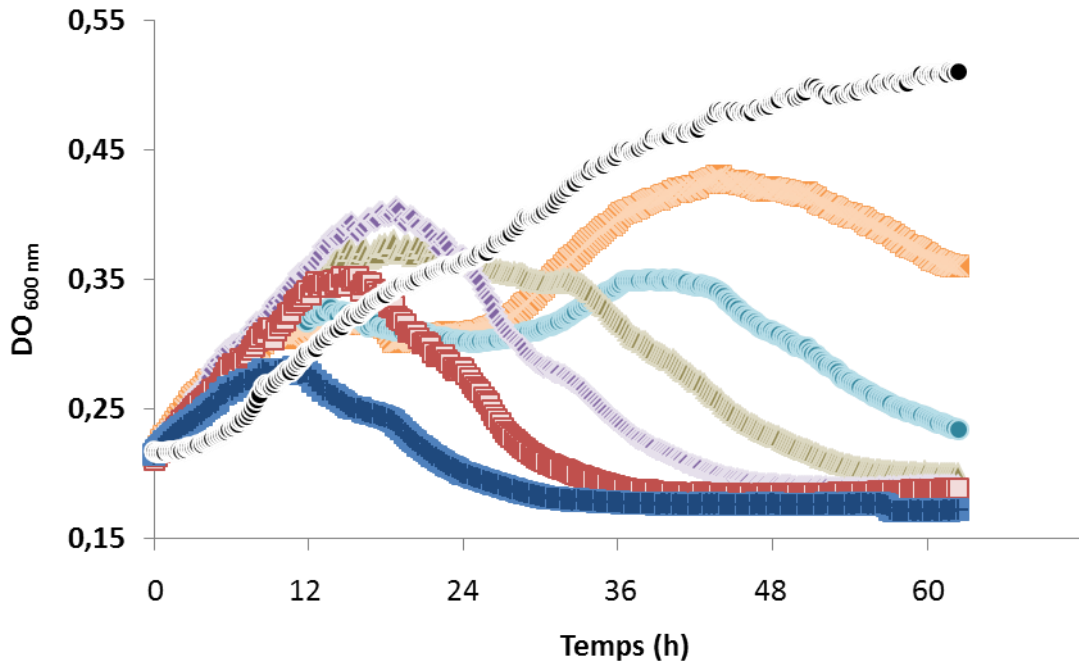
Figure 44. Aspect des plages de lyse formées par  $\phi 19-277$  sur la souche *O. oeni* IOEB S277.

étape d'acclimatation, au cours de laquelle les souches transitent dans un milieu de croissance mélangé au vin à ensemercer. Les phages ont besoin de cellules métaboliquement actives pour se répliquer. Binetti *et al.* (2002) ont ainsi montré que l'activité métabolique était nécessaire à l'injection d'ADN dans la cellule chez certains phages infectant *S. thermophilus*.

## 2. Des phages virulents sont présents dans l'écosystème : exemple du phage $\phi$ 19-277

La littérature rapporte de nombreux cas d'isolement d'oenophages à partir de vins dont le déroulement de la FML était normal ou altéré. Dans leur grande majorité, l'isolement mène à l'obtention de phages produisant des plages troubles, considérés comme tempérés. Cependant, lors de l'étude de l'inductibilité des prophages décrite dans le chapitre I, nous avons observé l'apparition de plages claires et donc la libération possible de phages lytiques dans le milieu. De même, lors de la campagne d'isolement de phages menée en 2011, nous avons observé la présence de plages d'aspect clair pour plusieurs échantillons. Le cas de  $\phi$ 19-277, un phage de type B isolé d'un vin de Pauillac a retenu notre attention. Le diamètre élevé (7 mm) des plages s'est révélé tout à fait atypique par rapport aux observations faites pour les 39 autres phages isolés dans le cadre de la thèse (**Fig. 44**).

Aucune turbidité n'est apparue au sein des plages formées par  $\phi$ 19-277 après prolongation de l'incubation des boîtes de Petri au-delà de sept jours. Une infection de la souche IOEB S277 par le phage a été réalisée en milieu liquide. Après la phase de lyse, une reprise de croissance a été observée à partir du sixième jour. Elle peut être due à l'apparition de clones lysogènes et/ou la croissance de mutants insensibles (Bacteriophage Insensitive Mutant, ou BIM). Pour lever l'ambiguïté, les cellules à J+14 ont été collectées, lavées et l'ADN total extrait. En accord avec le classement du phage dans le groupe type B, l'amplification PCR des régions *attL* et *attR* correspondantes a été recherchée. Aucun amplicon n'a été visualisé alors que l'amplification du site *attB<sub>B</sub>* a été obtenue.  $\phi$ 19-277 est



**Figure 45. Evolution de la croissance de la souche *O. oeni* IOEB S277 infectée par le phage  $\phi$ 19-277.**

Les essais ont été réalisés en microplaques à différentes MOI : 0,05 (+),  $5 \times 10^{-3}$  (□),  $5 \times 10^{-4}$  (◇),  $5 \times 10^{-5}$  (△),  $5 \times 10^{-6}$  (○),  $5 \times 10^{-7}$  (×). Témoin non infecté (●).



**Figure 46. Observation des particules du phage  $\phi$ 19-277 en microscopie électronique-Centre de Microscopie, Université Bordeaux.**

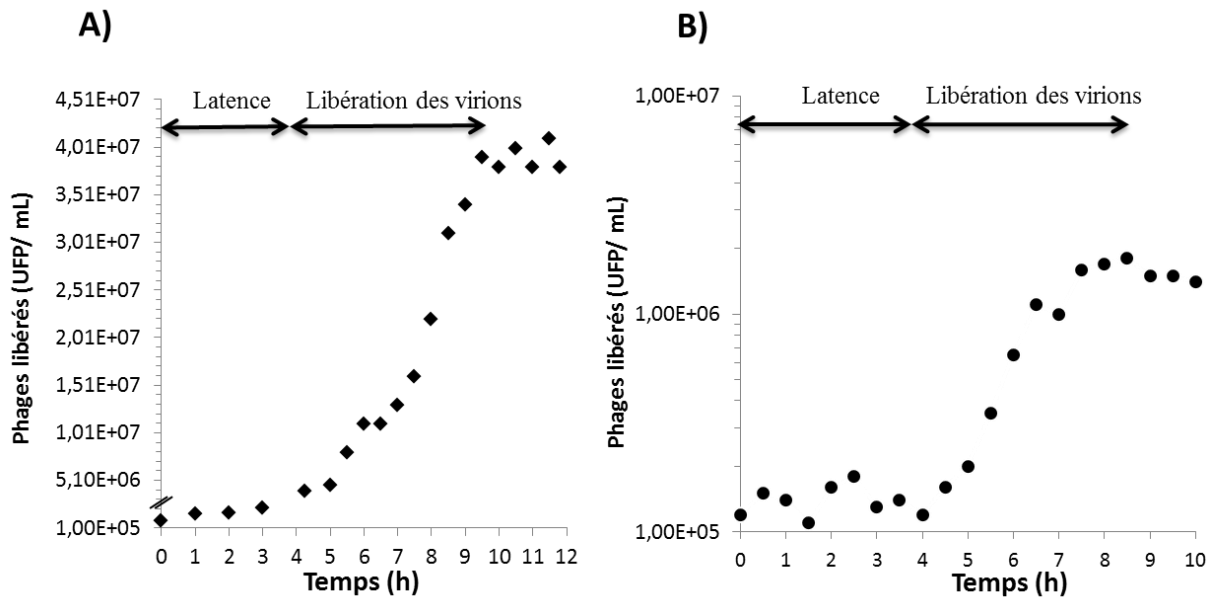
La barre représente 50 nm.

donc *à priori* un oenophage à développement strictement lytique. La reprise de croissance observée est donc vraisemblablement liée à l'émergence de BIMs (ce phénomène sera traité dans le chapitre suivant).

Des essais d'infection de la souche hôte IOEB S277 par le phage  $\phi$ 19-277 à différentes multiplicités d'infection (MOI) ont été réalisés en microplaques, et le suivi de densité optique a été réalisé toutes les 12 heures. Pour des MOI supérieures à 1, nous n'avons pas observé de lyse précoce (résultats non montrés). Ceci suggère l'absence de phénomène de « lysis from without ». Il s'agit de dommages létaux liés à l'adsorption de plusieurs phages sur la cellule sans multiplication intra-cellulaire du phage (Abedon, 2011). Les courbes obtenues pour des MOI plus faibles sont représentées sur la **figure 45**. Le phage  $\phi$ 19-277 est capable de lyser rapidement la souche indicatrice, et ceci dès 12 heures pour la concentration la plus forte en phages (MOI = 0,05). On observe une multiplication concomitante du phage dans le surnageant (résultats non montrés). Pour les autres valeurs de MOI, la lyse est plus tardive, et on note le succès de l'infection pour une MOI aussi faible que  $5 \times 10^{-7}$ . Dans l'objectif de produire rapidement des lysats concentrés de  $\phi$ 19-277, le choix d'une MOI faible a donc été favorisé. Des essais ont été ultérieurement effectués dans un volume supérieur (50 ml) et une MOI de  $5 \times 10^{-4}$  a été finalement retenue.

## 2.1. Ultra-structure de $\phi$ 19-277 et spectre d'hôte

Une suspension concentrée du phage a été observée en microscopie électronique (**Fig. 46**) Le phage  $\phi$ 19-277 est caractérisé par une capsidie icosaédrique de  $63 \pm 3$  nm de diamètre, et d'une longue partie caudale non contractile de  $272 \pm 4$  nm. Comme  $\phi$ 0608MC, le phage appartient à la famille des *Siphoviridae*. Le spectre lytique du phage a ensuite été testé sur une collection de souches appartenant aux espèces *O. oeni* (n=36) et *O. kitaharae* (n=3). Une inhibition spécifique de 10 souches (incluant la souche de propagation IOEB S277) a été observée. Parmi ces souches, on note que quatre (IOEB S450, S161, AWRIB429 et IOEB S277) sont des levains commerciaux, dont trois sont commercialisés par la même société. La question de l'émergence de phages virulents sur ces souches intensivement utilisées depuis plusieurs années peut donc, à ce stade, être posée. Toutes les souches sensibles appartiennent au groupe phylogénétique A établi par MLST (Bridier *et al.*, 2010), mais ne



**Figure 47. Courbes de développement intra-cellulaire ou « One-step growth » des phages  $\phi 19-277$  (A) et  $\phi 0608MC$  (B) sur la souche hôte IOEB S277 en milieu MRS $\phi$  à 25 °C. Les courbes représentent l'un des deux essais indépendants réalisés pour chaque phage.**

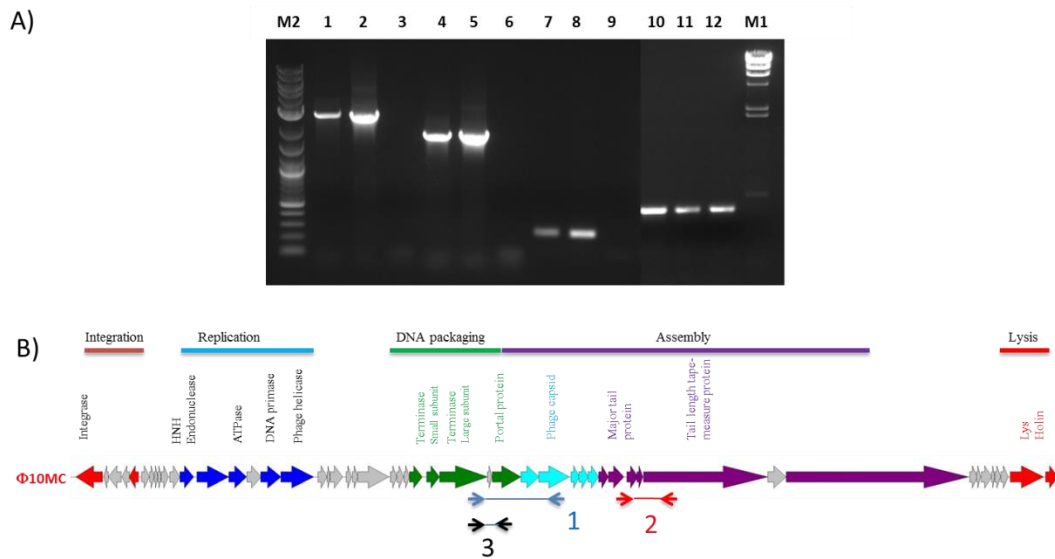
sont pas associées au sein d'une branche donnée. Leur contenu en terme de prophage est variable (**Chapitre I, Tab. XX**). Enfin, aucune des trois souches d'*O. kitaharae* ne s'est révélée sensible au phage  $\phi$ 19-277.

## **2.2. Adsorption et paramètres de développement intra-cellulaire (one step growth curve)**

L'adsorption du phage  $\phi$ 19-277 est rapide en milieu MRS, et  $77 \pm 7$  % des particules sont adsorbées après 1 h de contact avec les bactéries à 25 °C, ce qui est conforme aux observations antérieures sur les deux autres oenophages testés.

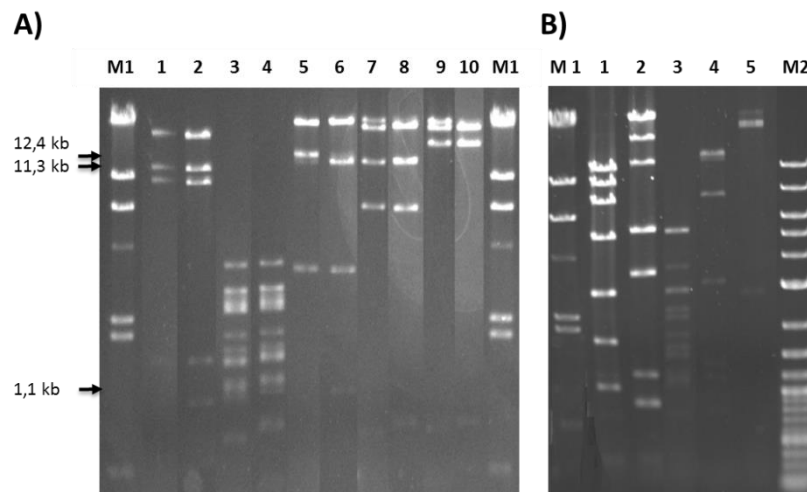
La virulence d'un phage est, entre autre, caractérisée par le nombre de particules libérées par chaque cellule au moment de sa lyse, et la durée nécessaire à cette libération. Ces paramètres ont été mesurés lors d'une expérience dite de "single-step growth curve" en milieu MRS $\phi$  à 25 °C. Le cycle observé se divise en trois parties distinctes, correspondant à une phase de latence (développement intra-cellulaire du phage), suivie d'une libération de particules puis d'un plateau (**Fig. 47 A**). La latence dure environ quatre heures, et la libération des particules est observée pendant les cinq heures qui suivent. Le nombre de particules libérées par cellule (ou « burst size ») pour le phage  $\phi$ 19-277 est de  $45 \pm 3$ , et est visible 10 h après la fin de l'adsorption. Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues pour le phage tempéré  $\phi$ 0608MC (**Fig. 47 B**). Les durées des périodes de latence et de libération des deux phages sont similaires. Cependant, le phage  $\phi$ 0608MC libère seulement  $8 \pm 5$  particules par cellule infectée. La mesure est ici purement indicative, car dans le cas d'un phage tempéré, le rapport entre le nombre de cellules lysogénisées et celles produisant le virus n'est pas connu dans les conditions appliquées. Il est à noter que Huang *et al.* (1996) ont mesuré la production de 25 particules par cellule infectée pour un autre phage tempéré nommé  $\phi$ 1002.





**Figure 48. Recherche de séquences communes entre les deux phages de type B  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC.**

A) Les ADNs de la souche IOEB B10 (pistes 1, 4, 7 et 10), et des phages  $\phi$ 10MC (pistes 2, 5, 8 et 11) et  $\phi$ 19-277 (pistes 3, 6, 9 et 12) ont servi de matrice pour des réactions PCR mettant en œuvre trois couples d'amorces (1, 2, 3) définies sur la séquence du prophage de la souche IOEB B10. Régions 1 (pistes 1, 2 et 3), 2 (pistes 4, 5 et 6), et 3 (pistes 7, 8 et 9). Les résultats obtenus en présence des amorces situées dans le gène *int* sont présentés sur les pistes 10, 11 et 12. M1, ADN du phage  $\lambda$  digéré par *Hind*III; M2, 2-Log DNA ladder (Biolabs). B) localisation des amorces utilisées sur le génome de  $\phi$ 10MC.



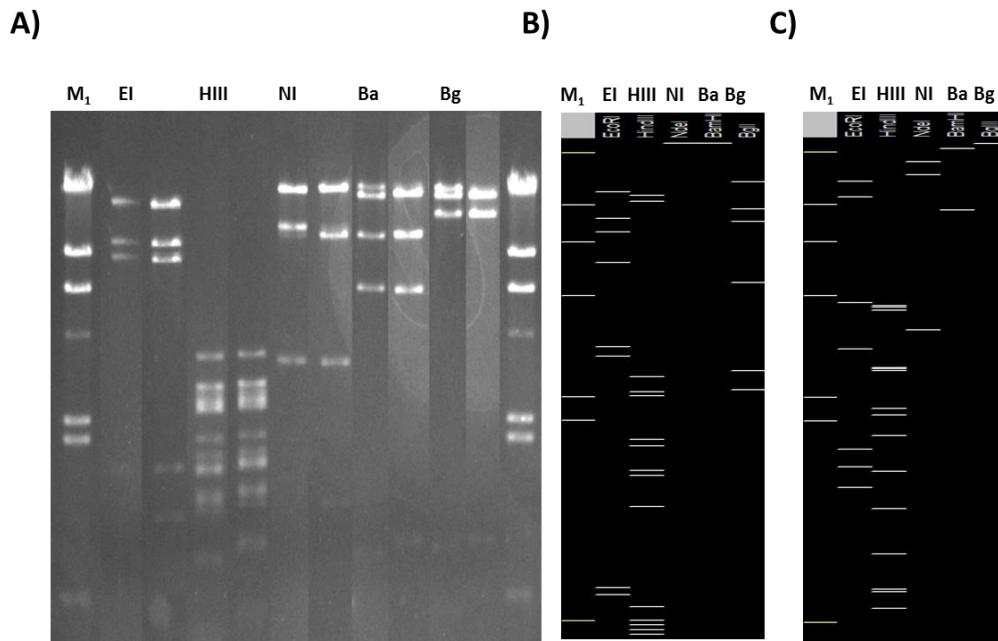
**Figure 49. Profil de restriction de l'ADN génomique des deux phages de type B  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC.**

A) ADN du phage  $\phi$ 19-277 digéré par *Eco*RI (piste 1 et 2); *Hind*III (piste 3 et 4); *Nde*I (piste 5 et 6); *Bam*HI (piste 7 et 8); *Bgl*II (piste 9 et 10). Pistes 1, 3, 5, 7 et 9: digestions non chauffées avant dépôt; pistes 2, 4, 6, 8 et 10: digestions chauffées. Le fragment *Nde*I (piste 5) contenant l'extrémité cohésive de l'ADN  $\phi$ 19-277 est indiqué par une flèche (12,4 kb) et les 2 fragments obtenus après chauffage sont également indiqués (11,3 and 1,1 kb); B) ADN du phage  $\phi$ 10MC digéré par *Eco*RI (piste 1); *Hind*III (piste 2); *Nde*I (piste 3); *Bam*HI (piste 4) and *Bgl*II (piste 5). M1, ADN du phage  $\lambda$  digéré par *Hind*III; M2, 2-Log DNA ladder (Biolabs).

### 2.3. Analyse du génome de $\phi$ 19-277

Le typage génétique du phage  $\phi$ 19-277 à l'aide des amorces spécifiques du gène *int* a été réalisé avec succès (**Fig. 48, pistes 10, 11 et 12**). Le génome viral contient donc une portion, ou la totalité d'un gène codant une intégrase. Ceci permet de suggérer que  $\phi$ 19-277 dérive d'un phage tempéré. L'émergence d'un dérivé virulent à partir d'un phage tempéré peut résulter de mutations ponctuelles, ou de délétions plus importantes dans le gène *int* et/ou dans d'autres gènes composant le module de recombinaison (Bruttin & Brüssow, 1996; Ford *et al.*, 1998). Une conversion lytique peut également résulter d'un phénomène de recombinaison entre un phage tempéré et un prophage abrité par la souche lysogène infectée. Ce cas a été récemment caractérisé chez  $\phi$ Ef11 infectant *Enterococcus faecalis* JH2-2, et expérimentalement relié à un échange de gènes de la région précoce (Zhang *et al.*, 2013). Afin de préciser l'origine du phage  $\phi$ 19-277, une première stratégie a consisté en la purification de son ADN génomique, dans l'optique de le comparer à ceux issus des autres phages B détectés dans notre étude. Ces phages correspondent aux trois prophages identifiés *in-silico* chez les souches IOEB C23, AWRIB202 et IOEB B10, et à un ensemble de 15 phages isolés lors des deux campagnes d'isolement à partir d'échantillons de vin. Ces analyses sont susceptibles de renseigner sur l'originalité éventuelle du phage, et éventuellement d'établir si des fragments de restriction associés au génome de  $\phi$ 19-277 sont partagés par les prophages connus de type B. Ceci pourrait constituer une première preuve d'une émergence de phage lytique à partir de prophages de type B.

Une première comparaison des ADNs de  $\phi$ 19-277 et de  $\phi$ 10MC a été réalisée par PCR, en utilisant trois couples d'amorces définis sur le génome du prophage de la souche IOEB B10 (**Fig. 48, pistes 1 à 9**). Aucune amplification n'a été obtenue en présence de l'ADN de  $\phi$ 19-277, alors que les ADNs du phage  $\phi$ 10MC et de la souche lysogène IOEB B10 ont montré l'amplification de fragments de taille attendue. Nous avons poursuivi l'analyse par la comparaison de profils de restriction des ADNs de  $\phi$ 19-277 et de  $\phi$ 10MC obtenus en présence de cinq enzymes de restriction différentes (**Fig. 49**). Sur la base de ces expériences, la taille du génome de  $\phi$ 19-277 a été estimée à  $38,5 \pm 1,3$  kb, et celle de  $\phi$ 10MC à  $39,5$  kb  $\pm$  1,2 (cette valeur est proche de la taille réelle de 38,7 kb obtenue à partir des données de séquençage de la souche B10). L'ADN de  $\phi$ 19-277 contient des extrémités de type *cos*, comme  $\phi$ 10MC (Gindreau, 1998). Malgré leur taille proche, la comparaison des profils de



**Figure 50. Profils de restriction de l'ADN génomique de  $\phi$ 19-277, A; et profils virtuels des ADNs prophagiques associés aux souches IOEB C23, B ; et AWRIB202, C.**  
M1, ADN du phage  $\lambda$  digéré par *Hind*III.

restriction pour les cinq enzymes testées montre que les ADNs des deux phages  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC sont bien distincts. De plus, la comparaison avec les profils des prophages IOEB C23 et AWRIB202 ne montre pas de bandes communes (**Fig. 50**).

La consultation de travaux antérieurs portant sur l'isolement d'oénophages nous a indiqué que les enzymes *EcoRI* et *HindIII* avaient été quasi-systématiquement testées afin de caractériser les ADNs phagiques. Les profils obtenus pour  $\phi$ 19-277 et ces différents phages ont donc pu être comparés (malgré le fait que l'appartenance au groupe B de ces derniers n'ait pas pu être questionnée étant donnée l'ancienneté des isollements réalisés entre 1991 et 1996). Ces oénophages incluent le phage tempéré  $\phi$ 1002 induit d'une souche lysogène isolée en Nouvelle Zélande (Huang *et al.*, 1996); les trois phages  $\phi$ Lo22A,  $\phi$ Lo26b et  $\phi$ Lo27b propagés sur des levains commerciaux en Suisse (Station Fédérale de Recherche Agronomique de Changins) (Boizet *et al.*, 1992), les quatre phages tempérés Pzt11-15, P32, P54, Pat5-12 (Arendt *et al.*, 1991), et enfin 17 phages tempérés induits de souches lysogènes et nommés fOg (18, 29, 31, 38, 39, 218, 22, 30, 32, 23, 42, 43, 44, 45, ML34, 4029 et PSU-I) (Santos *et al.*, 1996).  $\phi$ 19-277 a montré des profils uniques par rapport à tous ces phages. Les profils *EcoRI* ont notamment montré un nombre de fragments supérieur à sept pour tous les phages cités ci-dessus, alors que l'ADN de  $\phi$ 19-277 présente seulement quatre fragments *EcoRI*. Les digestions par *HindIII* permettent également une bonne discrimination car l'ADN de  $\phi$ 19-277 est le seul à générer des fragments dont la taille soit inférieure à 4,3 kb. La même observation a été faite lors de la comparaison de nos données avec celles correspondant à un panel de phages isolés de vins allemands (Arendt & Hammes, 1992).

## 2.4. Conclusion

Nos résultats montrent la présence de phages lytiques dans le vin, et précisent pour la première fois la vitesse de développement et la « burst size » d'un oénophage après infection de son hôte. La destruction des bactéries est effective 10 heures après adsorption du phage sur l'enveloppe cellulaire. La rapidité de l'infection est couplée à la libération dans le milieu d'une quantité conséquente de virions (proche de 50 pour chaque cellule infectée). De plus, nous avons montré que ce phage est actif vis-à-vis de quatre souches couramment utilisées dans les propriétés pour maîtriser les FML. Ces éléments font que l'émergence de



ce type de phages peut se révéler problématique pour *O. oeni*, par exemple lors de la phase de préparation et de stabilisation des levains.

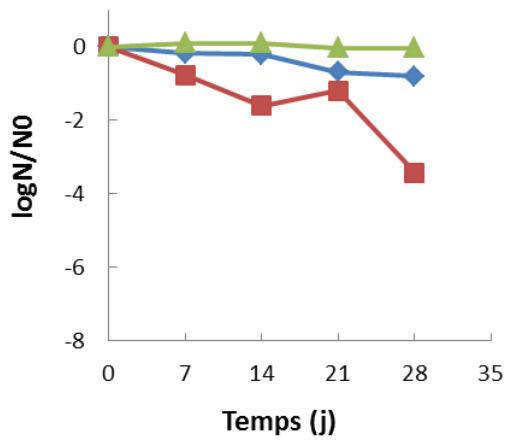
Nos premières analyses de l'ADN du phage suggèrent son originalité par rapport à  $\phi$ 10MC, et à plusieurs phages libres précédemment isolés dans différentes régions géographiques. De plus, les profils de restriction de l'ADN de  $\phi$ 19-277 sont distincts de ceux des prophages de type B présents chez les souches lysogènes IOEB B10, IOEB C23 et AWRIB202. L'origine de  $\phi$ 19-277 ne peut donc être précisée plus avant. La comparaison des profils de restriction entre les ADNs de  $\phi$ 19-277 et de 15 nouveaux phages est en cours. Une stratégie complémentaire et moins coûteuse en temps consistera également à séquencer l'ADN de  $\phi$ 19-277. Ces travaux seront réalisés dans le cadre du programme LYSOPLUS, sélectionné dans le cadre de l'appel d'offre 2014 par l'ANR auquel je participerai en collaboration avec une autre doctorante.

### 3. Persistance des oenophages dans l'environnement œnologique

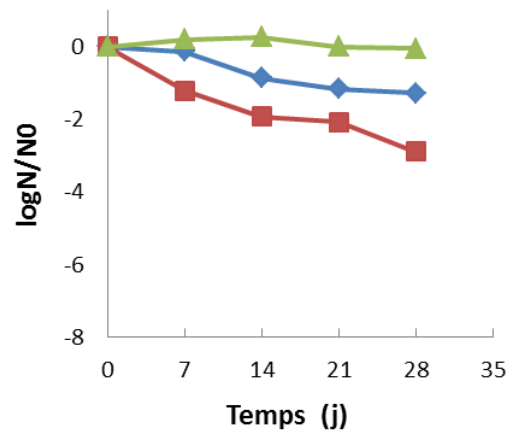
Les oenophages sont décrits comme sensibles à certains composés présents dans le vin comme le  $\text{SO}_2$ , ou le pH acide (Davis *et al.*, 1985; Poblet-Icart *et al.*, 1998). C'est également le cas de la bentonite qui est utilisée pour le collage des vins (Henick-Kling *et al.*, 1986). L'étape de collage permet de limiter le phénomène de casse protéique car ce dernier entraîne l'apparition d'un trouble préjudiciable dans le produit. Mise en suspension, la bentonite forme une dispersion colloïdale dont les particules chargées négativement ont la propriété de fixer les protéines qui, au pH du vin, sont chargées positivement. La bentonite, qui est une colle lourde, chutera facilement au fond des cuves et sera éliminée par soutirage.

Les facteurs physiques et chimiques peuvent inactiver les particules phagiques *via* des dommages liés aux éléments structuraux et/ou des modifications structurales de leur ADN (Jonczyk *et al.*, 2011). La nature des mécanismes impliqués a été peu abordée chez les oenophages. Par ailleurs, la plupart des travaux menés jusqu'à présent ont consisté à tester l'effet de composés du vin sur l'activité d'un seul ou de quelques phages, sans aucune information sur la représentativité des modèles viraux choisis. La mise à disposition de

A) MRS



B) Milieu au jus de raisin



**Figure 51. Persistance de trois lysats phagiques à 10 °C en milieu MRS (A) et en milieu jus de raisin (B).**

Les lysats phagiques ont été dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans les trois milieux, et incubés à 10 °C. La présence de phages a été mesurée au moment de l'inoculation (N0) puis périodiquement (N) par la technique de double couche. Le rapport  $N/N_0$  correspond au facteur de réduction logarithmique. Il traduit la réduction progressive en phages actifs en unités logarithmiques. ▲,  $\phi 34\text{-S51}$  (type D); ■,  $\phi 34\text{-S161}$  (type A); ◆,  $\phi 19\text{-277}$  (type B).

plusieurs lysats phagiques typés nous a donc mené à comparer la persistance de différents phages vis-à-vis de contraintes associées à la vinification. Cinq phages ont été retenus pour les différentes expériences présentées. Les deux phages  $\phi 19-277$  et  $\phi 10MC$  appartiennent au groupe B et leur ADN ont des profils de restriction différents. De plus le premier est un phage virulent et le second est tempéré. Le choix de ces deux phages répond à l'objectif de caractériser les différences éventuelles existant entre deux phages partageant le même groupe, mais ayant deux cycles de vie différents. Deux phages du groupe D ont également été retenus : OE33SaG et  $\phi 32-S51$ , le premier a été isolé d'un moût de cépage de blanc, et le second d'un vin rouge. Enfin  $\phi 0608MC$  est un phage tempéré de type A, obtenu après induction de la souche lysogène IOEB 0608 à la mitomycine C. Les évolutions des numérations phagiques (UFP/mL) au cours du temps en présence de différents facteurs sont présentées. Alternativement, la comparaison des facteurs de réduction logarithmique (RF) a parfois été préférée, lorsque les différents lysats ne présentaient pas exactement le même titre en début d'expérience.

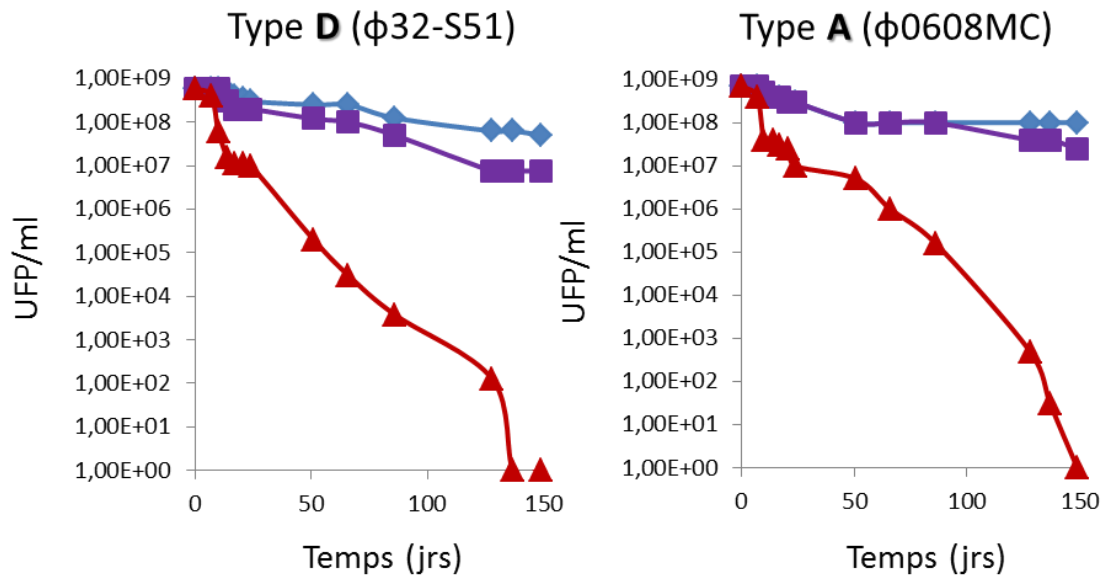
### 3.1. Stabilité pendant le stockage à froid et persistance dans le vin

#### 3.1.1. Stockage en froid positif en MRS/jus de raisin

La stabilité d'un lysat concentré du phage  $\phi 19-277$  ( $3,75 \times 10^9$  UFP/mL) a été évaluée pendant le stockage à 10 °C. Nous avons observé que le titre restait stable plusieurs mois, et une concentration résiduelle de  $1,4 \times 10^7$  UFP/mL a été mesurée après 24 mois de stockage (RF  $\sim 2$ ), montrant que le phage est stable lorsque conservé au froid en bouillon MRS (résultats non montrés). Ceci est en accord avec les observations faites par Ackermann *et al.* (2004) suggérant que les phages caudés sont relativement résistants à 4 °C (certains sont encore actifs après 10 – 12 ans dans ces conditions).

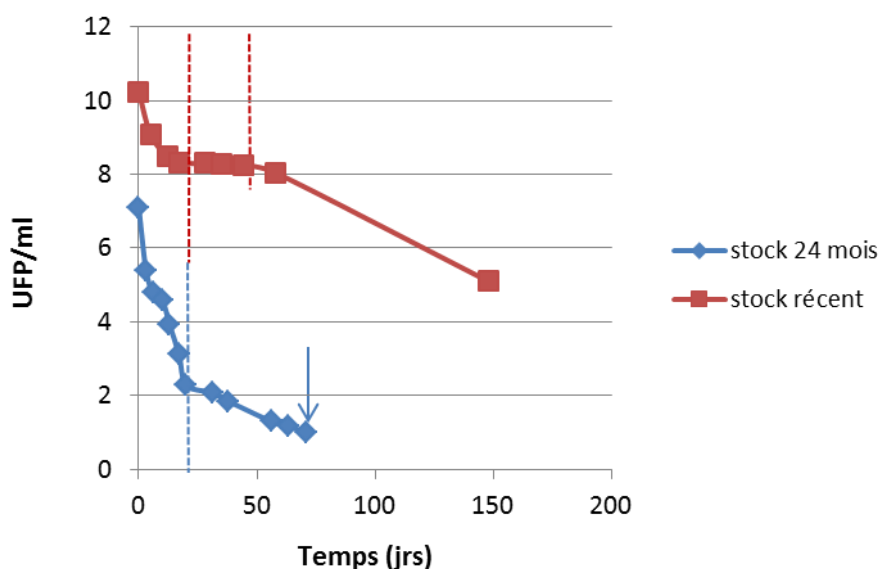
La persistance des phages pendant le stockage au froid **en milieu MRS** a été également suivie pour les phages  $\phi 34-S51$  (type D),  $\phi 34-S161$  (type A) et  $\phi 19-277$  (type B), et comparée à celle obtenue en **milieu au jus de raisin (Fig. 51)**. Pour chaque phage, les variations des stocks au cours du temps sont semblables dans les deux milieux. On observe une sensibilité accrue de  $\phi 34-S161$  dont le titre chute de RF = 3,4 et RF = 2,8 après 28 jours de stockage en MRS, et en milieu au jus de raisin, respectivement, tandis que les deux autres





**Figure 52. Persistence de deux lysats phagiques à 8 °C pendant 150 jours en milieu MRS (bleu, ◆), en milieu jus de raisin (violet, ■) et dans un vin rouge (rouge, ▲).**

Les phages ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans les trois milieux et incubés à 8 °C. La présence de phages a été mesurée au moment de l'inoculation puis périodiquement par la technique de double couche.



**Figure 53. Persistence de deux lysats phagiques de φ19-277 à 10 °C dans un vin rouge.**

Les stocks étaient âgés de 24 mois (◆) et de 15 jours (■) en début d'expérience. Ils ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans le vin et incubés à 4 °C. La présence de phages a été mesurée au moment de l'inoculation puis périodiquement par la technique de double couche. La flèche correspond à la récupération du phage φ19-277 «survivor» dans la dernière plage de lyse visualisée après 71 jours de stockage dans le vin.

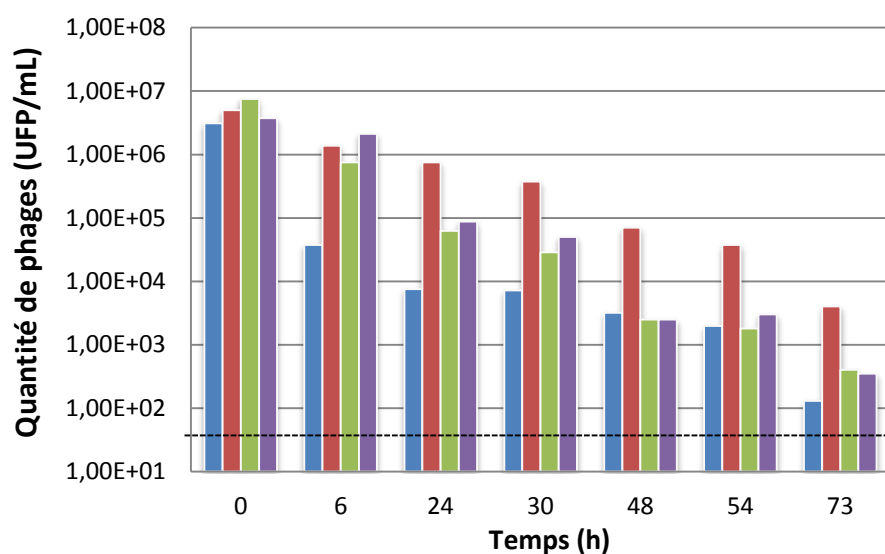
stocks sont stables. Les phages persistent encore plus durablement dans ces deux milieux. Ainsi la **figure 52** montre une chute modérée du titre (1 à 2 RF) pour les phages  $\phi$ 32-S51 (D) et  $\phi$ 0608MC (A) après 150 jours de conservation.

### **3.1.2. Stockage en froid positif dans le vin**

**Le stockage dans le vin rouge** est plus perturbateur vis-à-vis des particules phagiques (**Fig. 52**). Malgré des cinétiques légèrement différentes pour les deux phages testés ( $\phi$ 32-S51, type D et  $\phi$ 0608MC, type A), des particules infectieuses sont quantifiables jusqu'à 128 et 132 jours de stockage dans le vin, respectivement.

La durée de stockage des particules à 4 °C précédant leur introduction dans le vin peut avoir une incidence sur les persistances mesurées. Pour le vérifier, nous avons utilisé deux lysats du même phage  $\phi$ 19-277. Le premier correspond au lysat qui été stocké pendant 24 mois à 8 °C, tandis que le deuxième a été réalisé extemporanément. Les lysats, après dilution dans le même vin, ont des courbes d'inactivation très différentes (**Fig. 53**). La cinétique d'inactivation se décompose en phases distinctes. On observe tout d'abord une première cinétique, rapide, pendant environ 20 jours. L'inactivation est plus importante pour le stock «ancien» suggérant que les particules correspondantes sont plus fragilisées vis-à-vis du vin que les particules propagées plus récemment. Après 20 jours, les concentrations dans le lysat « ancien » continuent de chuter mais l'inactivation est plus lente. Dans le second stock cette seconde phase est précédée d'un plateau. Ces éléments peuvent indiquer que des cibles différentes sont altérées successivement au sein des particules au cours des deux périodes et concourent à l'inactivation des phages.

Ces expériences sont importantes car elles démontrent la nécessité de travailler avec des stocks produits sur la même période de temps, dès lors que l'inactivation de plusieurs phages doit être comparée. Nous avons donc particulièrement veillé à ce paramètre dans la suite du travail.



**Figure 54. Persistance de phages stockés à température ambiante dans un vin rouge.**

Les phages testés sont :  $\phi$ 10MC, de type B (■), OE33SaG, de type D (■),  $\phi$ 19-277, de type B (■), et  $\phi$ 0608MC, de type A (■). Les phages ont été dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans le vin et incubés à 4 °C. La présence de phages a été mesurée au moment de l'inoculation puis périodiquement par la technique de double couche. Le seuil de détection est indiqué par un trait en pointillé.

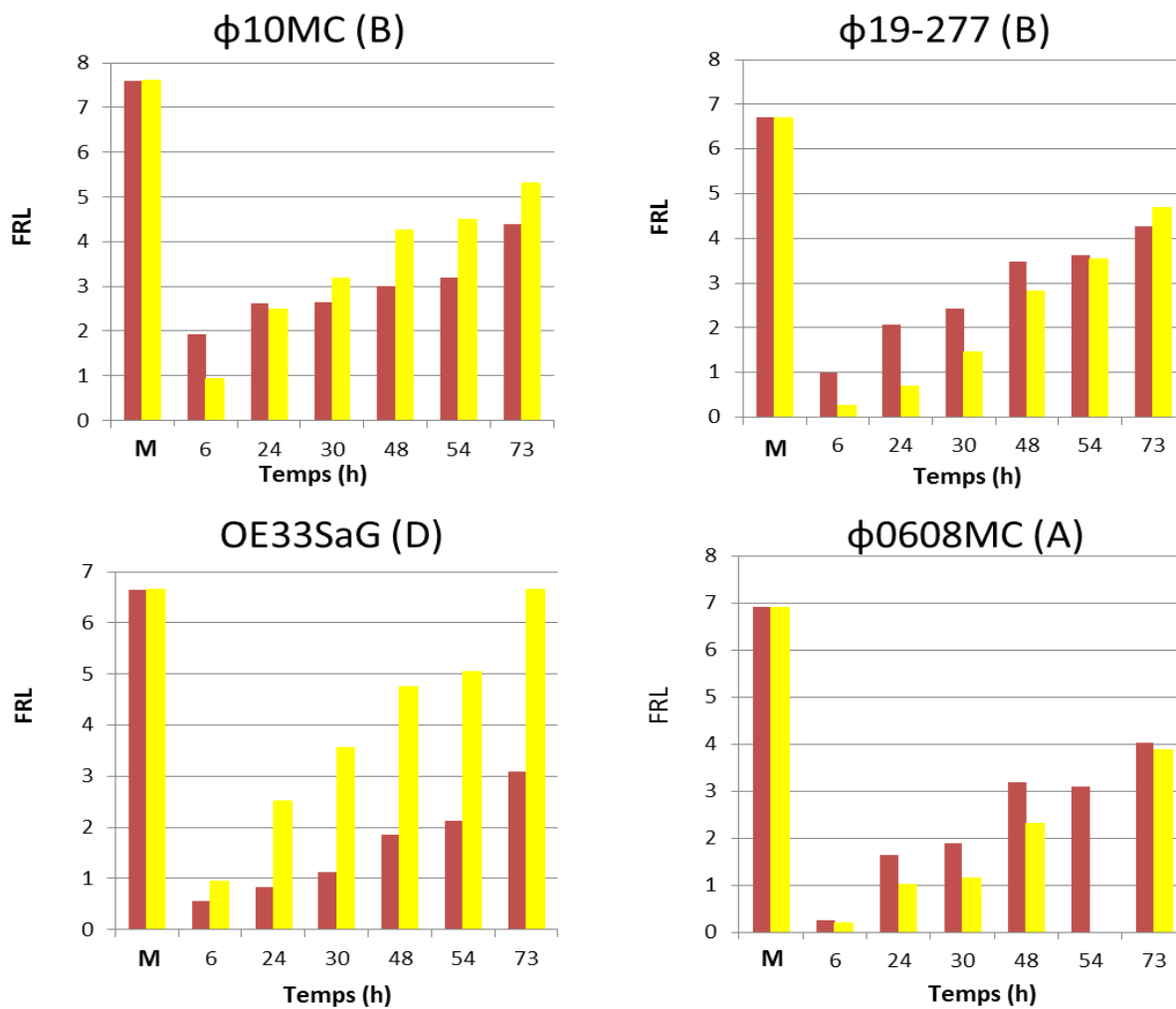
### 3.1.3. L'inactivation des phages est plus rapide à température ambiante

Lorsque les phages sont inoculés dans le vin rouge (Merlot du pays d'OC; pH 3,7) et incubés à température ambiante, l'inactivation est beaucoup plus rapide que celle observée précédemment à une température comprise entre 8 et 10 °C (**Fig. 54**). Ainsi après 73 heures, les stocks ont déjà perdu entre 3 et 4 RF. La valeur de RF atteint 4,3 pour  $\phi$ 10MC (B) et 4 pour  $\phi$ 19-277 (B) et  $\phi$ 0608MC (A). Le phage de type D, OE33SaG, résiste mieux que les autres, et le RF est seulement de 3 après 73 h d'incubation. Ces premiers résultats montrent l'hétérogénéité dans la tolérance des particules dans l'environnement.

### 3.1.4. Persistance comparée en vin rouge et en vin blanc

L'étude précédente montrant des degrés variables de persistance pour les quatre phages dans le vin rouge, nous avons comparé ces valeurs avec celles obtenues dans un vin blanc (Chardonnay du pays d'Oc; pH 3,47). Les résultats comparatifs vin rouge/vin blanc sont présentés pour chaque phage testé :  $\phi$ 10MC et  $\phi$ 19-277 (B),  $\phi$ 0608MC (A) et OE33SaG (D) (**Fig. 55**).  $\phi$ 0608MC et  $\phi$ 19-277 évoluent de manière similaire dans les deux vins. Le RF est de 3 après 73 h de stockage. Le vin rouge inactive plus rapidement les deux phages. La situation est inversée pour  $\phi$ 10MC et OE33SaG. L'inactivation est plus rapide et plus importante dans le vin blanc par rapport au vin rouge. Ainsi des RF supérieurs à 5 et 6 sont mesurés pour les deux phages dans le vin blanc, respectivement.

Ce premier essai dans un vin blanc met en évidence des sensibilités particulières pour certains phages, et le cas de OE33SaG est particulier. Les profils de restriction de ce phage diffèrent de ceux obtenus pour tous les autres phages de type D isolés à partir de vins rouge, et de souches lysogènes (Chapitre II). La sensibilité de OE33SaG au vin blanc est à rapprocher d'une observation faite lors de son isolement. Le phage a en effet été isolé à partir de Sauvignon (cépage blanc), immédiatement après collecte du moût. Cependant, lorsque la recherche a été reconduite après conservation du moût cinq jours à 25 °C, aucune plaque n'a été isolée et la population de *O. oeni* n'était plus détectable. OE33SaG a donc une dynamique particulière dans l'environnement. Il est présent immédiatement après pressurage, mais disparaît ensuite rapidement. La niche de ce phage pourrait être restreinte



**Figure 55. Inactivations comparées de quatre onophages en vin rouge et en vin blanc à température ambiante.** Les phages ont été dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans les deux vins et incubés à 4 °C. Le logarithme de la concentration initiale du stock utilisé (RF max) est représentée par la lettre M. Les RF ont été calculés après 6, 24, 30, 48, 54 et 73 h d'incubation des particules dans les vins.

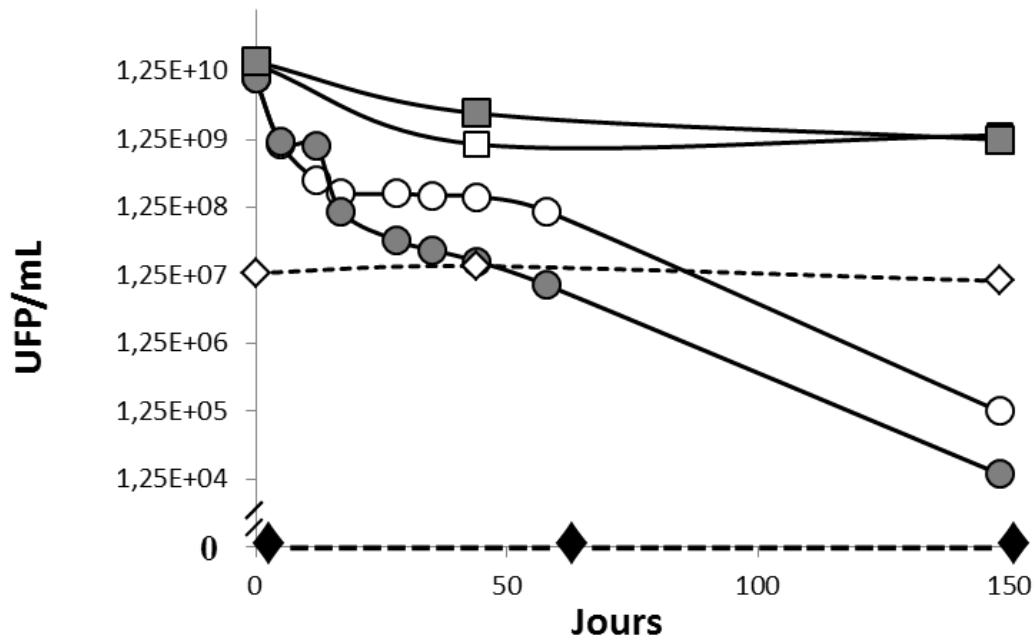
au cépage utilisé, expliquant l'échec d'isolement dans les vins rouges. Il est également possible que les phages de ce type, ou bien les souches susceptibles d'être lysogénisées, disparaissent de façon précoce du milieu. Ceci pourrait expliquer l'absence de prophages correspondant à OE33SaG dans les cinquante génomes analysés. En effet, les souches dont le génome a été déterminé, ont dans leur grande majorité été isolées à partir de stades de vinification plus avancés (FML).

Les paramètres responsables de la sensibilité accrue de OE33SaG dans le vin blanc ne peuvent pas être identifiés à ce stade. OE33SaG peut être particulièrement sensible à l'acidité. Les vins rouge et blanc avaient en effet des pH différents (3,7 et 3,47 respectivement). Il est possible qu'un écart de 0,2 unités pH produise une telle différence chez OE33SaG. La létalité supérieure du vin blanc (Chardonnay) vis-à-vis du phage peut aussi être liée à une sensibilité aux sulfites. Le sulfitage (apport de  $\text{SO}_2$ ) peut être réalisé sur moût ou sur vendange. Les teneurs en  $\text{SO}_2$  n'ont pas été déterminées lors de l'expérience. La reproduction de la manipulation doit donc être effectuée dans d'autres vins blancs, dont l'ensemble des paramètres physico-chimiques auront été testés au préalable.

### 3.1.5. Phages survivant au stockage dans le vin rouge

Lors du suivi de la persistance du stock de 24 mois du phage  $\phi 19-277$  dans le vin rouge à 10 °C, les dernières plages de lyse obtenues après 71 jours de stockage ont été récupérées (**Fig. 53**). Un phage nommé « survivor » ou  $\phi 19-277_s$  a été purifié à partir des plages. Le phage original et le phage « survivor » ont été propagés en milieu MRS $\phi$  afin de préparer deux nouveaux lysats. Les persistances des phages  $\phi 19-277$  et  $\phi 19-277_s$  ont été mesurées au cours du temps dans le même vin rouge (**Fig. 56**).

Notre essai indique que la cinétique d'inactivation du phage survivant  $\phi 19-277_s$  est légèrement plus rapide que celle du phage original  $\phi 19-277$  à partir du 17<sup>ème</sup> jour. La différence est d'environ 1 unité  $\log_{10}$  et perdure jusqu'à la fin de l'expérience. Sous réserve de réalisation d'un second essai indépendant, l'hypothèse privilégiée est que le stockage prolongé dans le vin a peut être sélectionné un variant déjà présent à faible concentration dans le lysat initial. Les premières comparaisons des profils de restriction ne montrent pas



**Figure 56. Persistance du phage  $\phi$ 19-277 dans le vin.**

Le lysat correspondant au phage original (○) et au survivant (●) a été dilué dans le vin rouge et la concentration a été évaluée périodiquement par la technique de la double couche. Alternativement, des aliquotes ont été prélevées, et les particules ont été précipitées au PEG, traitées à la DNase puis quantifiées par qPCR (□, ■). Des témoins ont été réalisés dans lesquels les particules ont été remplacées par de l'ADN viral (quantité correspondant à  $10^7$  UFP/mL). Les témoins ont été collectés, précipités et traités (◆) ou non (◇) à la DNase avant la quantification par qPCR.

de différence entre les deux ADNs. Après cette étape, les perspectives de ce travail seront de réaliser des courbes d'infection en présence de différentes MOI pour les deux phages, et de comparer leurs paramètres d'adsorption, de burst-size, et de spectre d'hôte.

### 3.2. Stabilité aux contraintes unitaires appliquées en bouillon MRS

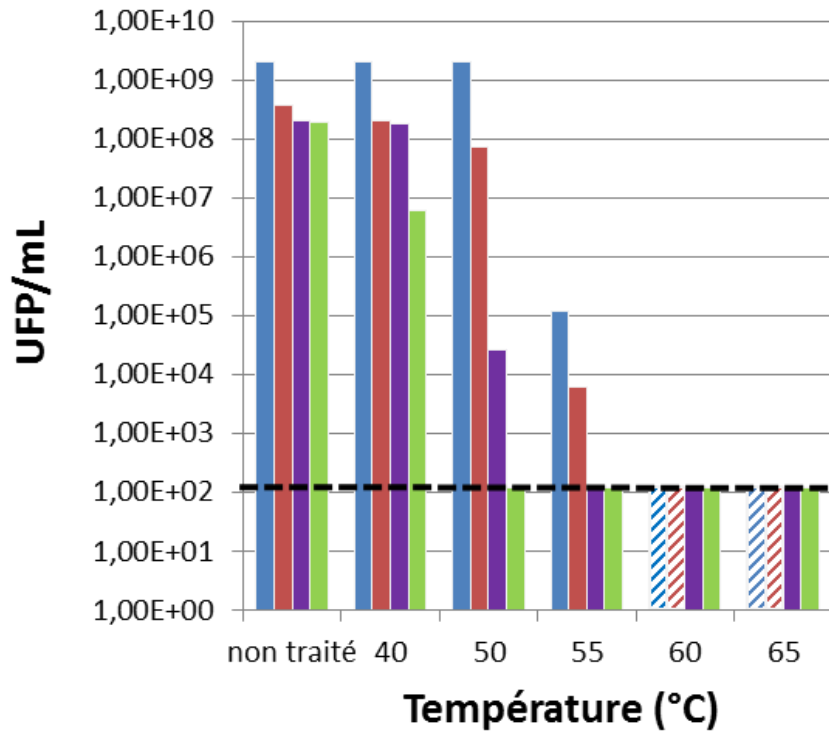
Les inactivations liées à la chaleur, à l'acidité et à la présence d'éthanol ont été testées en bouillon MRS sur quatre phages différents :  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 10MC (B), OE33SaG (D) et  $\phi$ 0608MC (A), dont les lysats ont été produits sur la même période de deux semaines précédant la réalisation des tests. Les phages  $\phi$ 10MC (B) et OE33SaG (D) ont été retenus car leur sensibilité particulière, notamment dans le vin blanc, a été montrée dans la première partie de l'étude.

#### 3.2.1. Stabilité à la chaleur

Les quatre lysats phagiques ont été traités à la chaleur pendant 15 minutes en milieu MRS et les phages résiduels ont été quantifiés par la technique de la double-couche (**Fig. 57**). Des différences importantes en matière de stabilité ont été observées entre les phages. Le phage le plus stable est  $\phi$ 10MC (B), et une température de 55 °C produit une chute de 4 RF de son titre. Une chute similaire (~ 4,5 RF) est observée pour le phage OE33SaG (D). Dans les mêmes conditions, les deux autres phages  $\phi$ 0608MC et  $\phi$ 19-277 montrent des titres inférieurs au seuil de détection (100 UFP/ml) et sont donc plus sensibles à la température. Le phage le plus sensible,  $\phi$ 19-277, est déjà affecté à 40 °C (RF 1,3) et son titre décroît ensuite très sensiblement lorsque la température atteint 50 °C (RF > 6), ce qui n'est pas le cas des trois autres phages. Une température de 60 °C inactive les quatre phages testés (**Fig. 57**).

La littérature comporte de nombreuses études d'évaluation de la résistance thermique des phages de BL, dont la plupart sont d'origine laitière. Dans ces travaux, l'inactivation a été testée à température élevée, et les couples température/temps choisis correspondent à ceux traditionnellement utilisés dans le but de traiter le lait dans cette industrie (63 °C/30 min, 72 °C/15 sec, et 82 °C/10 min). De plus les tests ont souvent été





**Figure 57. Bactériophages résiduels après 15 minutes de traitement thermique.**

Les phages testés sont :  $\phi$ 10MC, de type B (■), OE33SaG, de type D (■),  $\phi$ 19-277 de type B (■), et  $\phi$ 0608 MC, de type A (■). Le seuil de détection est indiqué par un trait en pointillé.

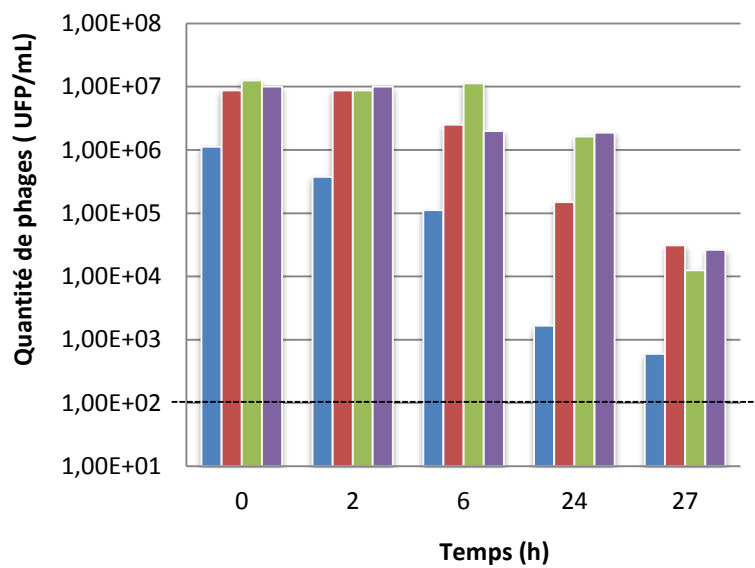
Les colonnes hachurées indiquent que la concentration est inférieure ou égale à la valeur seuil de détection indiquée par un trait en pointillé.

réalisés en utilisant de la poudre de lait reconstituée (skim milk) pour la resuspension des phages, ce qui confère une protection spécifique aux phages vis-à-vis de l'inactivation. Il est donc difficile de faire des comparaisons entre ces données et nos résultats obtenus en milieu MRS. L'ensemble des données acquises chez les phages de BL démontrent cependant qu'il existe une grande diversité dans la thermorésistance des phages, et que la résistance dépend plus de la nature des particules phagiques que de l'hôte infecté (Guglielmotti *et al.*, 2012). On notera que certains phages de lactobacilles survivent à 90 °C pendant 10 minutes (Capra *et al.*, 2010). Les phages (de BL) les plus sensibles sont rapidement inactivés à 63 °C. C'est le cas du phage Cb1/204 infectant *Lb. delbrueckii*, qui est complètement inactivé (RF > 6.5) après 15 minutes à 63 °C en bouillon MRS. Par contre, selon Pujato *et al.* (2014), un traitement de plus de 45 minutes à 63 °C en MRS inactive seulement une partie de la population virale (RF 2) pour six siphophages d'origine laitière infectant *Leuconostoc mesenteroides*.

En conclusion, les quatre oenophages présentent des sensibilités différentes. Cependant ils sont détruits lorsque la température est supérieure à 60 °C. Ce paramètre peut être intéressant en cas de traitement thermique des vendanges. En effet, la thermovinification est parfois utilisée et consiste en un traitement entre 60 °C et 80 °C. Historiquement, le raisin récolté était chauffé pour écarter le risque de laccase du Botrytis. Le procédé de traitement thermique a également par la suite révélé des facilités en termes de vinification de gros tonnages, de gain de temps et de place en cuverie. Il permet également l'extraction des polyphénols, le traitement des enzymes d'altération et enfin la destruction des arômes végétaux de la vendange.

### 3.2.2. Stabilité des oenophages en MRS acide

La majorité des vins ont un pH entre 3 et 4. Des essais préliminaires d'inactivation ont été effectués dans du bouillon MRS dont le pH a été ajusté à 3. Un stock concentré du phage  $\phi$ 19-277 après dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans le milieu acide ( $10^7$  UFP/mL) a montré une inactivation totale après seulement 2 heures de contact à température ambiante. Nous avons donc choisi de comparer la résistance des phages à pH 3,5 et les concentrations résiduelles en phages ont été mesurées après 2, 6, 24 et 27 heures de contact (**Fig. 58**).



**Figure 58. Bactériophages résiduels après 27 h de traitement en milieu MRS acide (pH 3,5).** Les phages testés sont :  $\phi$ 10MC, de type B (■), OE33SaG, de type D (■),  $\phi$ 19-277, de type B (■), et  $\phi$ 0608MC, de type A (■). Les lysats ont été dilués au 1/10ème dans le milieu, et les phages résiduels été quantifiés par la technique de double-couche. Le seuil de détection est indiqué par un trait en pointillé.

L'acidification du milieu MRS à pH = 3,5 (au lieu de 4,8) affecte la survie des quatre phages, mais ne les inactive pas totalement. Le phage  $\phi$ 10MC semble inactivé plus rapidement, et un RF proche de 3 est atteint dès 24 h de traitement. Ce phage a montré une sensibilité accrue dans le vin par rapport aux autres oenophages testés. Cependant, il s'est avéré être le plus thermotolérant. En MRS acide, les trois autres phages ont montré des RF plus modestes allant de 1 à 2.

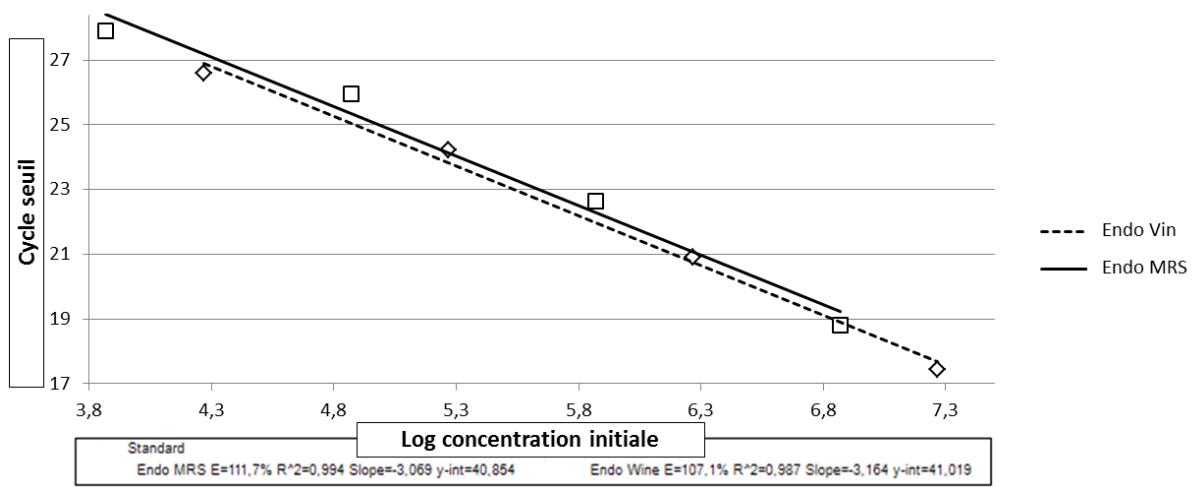
A la fin de l'expérience, l'échantillon du phage  $\phi$ 19-277 a été dilué 10 fois dans du bouillon MRS pH 4,8 et stocké à 4 °C. Aucune restauration du pouvoir infectieux du phage n'a été observée, ce qui suggère que l'inactivation des particules virales liées à l'acidité est irréversible.

### 3.2.3. Stabilité en présence d'éthanol en milieu MRS

L'éthanol est un composé inhibiteur vis-à-vis des bactéries. Sa concentration varie entre 12.5 % et 14.5 % (vol/vol) selon les vins. Une concentration de 15 % n'a pas provoqué de réduction du titre des lysats après 72 h d'incubation (résultats non montrés). Cette concentration ne produit généralement pas de dommages chez les phages infectant les BL (Guglielmotti *et al.*, 2011). Des concentrations plus fortes (75 % et 100 % éthanol) sont nécessaires afin d'inactiver les phages infectant les lactocoques (Suárez & Reinheimer, 2002; Buzrul *et al.*, 2007) et les phages infectant les espèces du genre *Leuconostoc* (Pujato *et al.*, 2014). L'effet antibactérien attribué à l'éthanol est lié à l'existence de perturbations dans la fraction lipidique de la membrane plasmique. L'absence de membranes lipidiques chez les membres de l'ordre des *Caudovirales* est la raison pour laquelle ces phages sont naturellement plus résistants que les bactéries au stress éthanolique.

### 3.2.4. Conclusions

Les différents tests réalisés soulignent la persistance des phages dans le milieu vin et la protection apportée lors d'un stockage au froid. Il existe une très forte variabilité selon les phages testés. Parmi les facteurs de résistance des phages à leur environnement, il est probable que la composition de la capsid joue un rôle primordial. Le séquençage des



**Figure 59. Quantification des oenophages par qPCR.** Courbes de calibration obtenues sur particules sans et avec précipitation préalable des particules.

génomés des phages libres isolés du vin ( $\phi$ 19-277 et OE33SaG) devrait permettre de comparer les gènes associés à la morphogénèse des virus, et de voir si leur nature et leur distribution est variable au sein des groupes A, B et D.

Nos résultats suggèrent que la détection ou la numération de phage dans le produit final (le vin) ne donne pas l'image de la dynamique des virus qui a précédé au cours de la vinification, et qui est probablement liée au cépage et à l'itinéraire technologique suivi. Une population particulière existe aux premières étapes de la vinification, du moins en blanc. Ces phages sont susceptibles d'avoir des génotypes et des phénotypes distincts, et il est possible qu'ils exercent un rôle dans la régulation de la population de *O. oeni* dès les premières étapes. Ces éléments sont à prendre en compte dans le développement de levains d'inoculation précoce, constitués de levures et de souches de *O. oeni* simultanément inoculées dans le moût.

#### 4. Des particules non infectieuses subsistent dans le vin

Afin de mieux comprendre la nature des dommages induits par le vin sur les particules virales, nous avons mis au point une stratégie de quantification des oenophages présents dans la matrice (Matériel & Méthodes, paragraphe 2.3.3). Cette technique a nécessité l'optimisation de l'extraction de l'ADN du phage. L'étape est critique sur toutes les matrices alimentaires (Ly-Chatain *et al.*, 2011), et plus particulièrement sur le vin qui contient de nombreux composants (polyphénols,  $SO_2$ ,...) susceptibles d'inhiber l'amplification. Les particules phagiques ont été concentrées par précipitation au PEG. Après plusieurs lavages, les particules ont servi de matrice pour une réaction qPCR ciblant la région conservée dans le gène de l'endolysine des oenophages (Chapitre II, paragraphe 1.1). Deux courbes de calibration ont été réalisées sur les particules diluées en MRS, puis sur des suspensions diluées puis traitées par précipitation au PEG (**Fig. 59**).

Le protocole nous a permis de suivre les phages  $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 19-277<sub>s</sub> au cours du stockage dans le vin (**Fig. 56**). Les résultats montrent que les concentrations restent stables tout au long de l'incubation dans le vin. Alors que les concentrations en particules



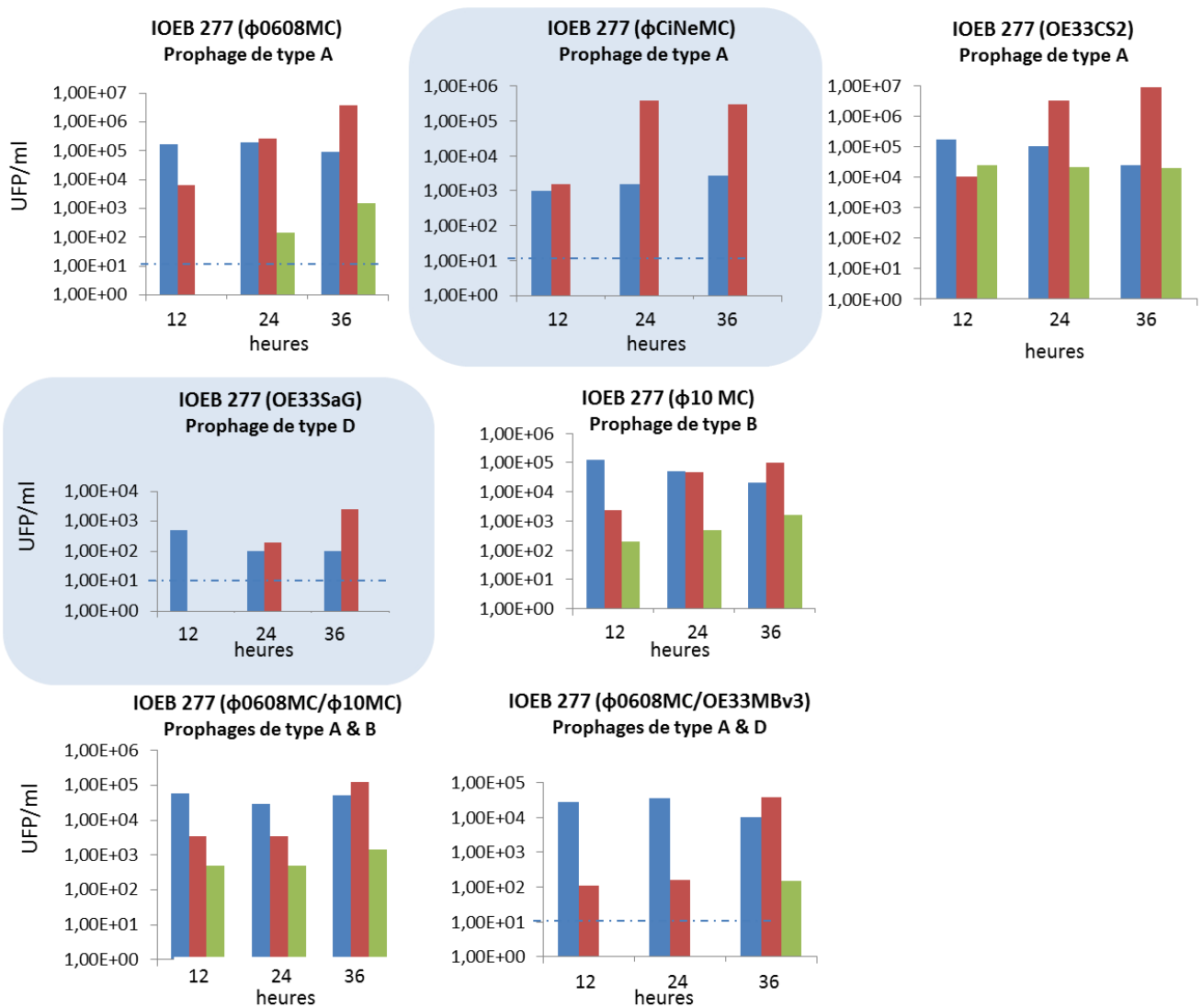
infectieuses évaluées par la technique de la double-couche ont considérablement chuté après 150 jours de stockage, les concentrations estimées mesurées par qPCR n'ont chuté que d'une seule unité  $\log_{10}$ . Le vin ne montrait pas de signal avant l'introduction de particules.

Nous avons remplacé les particules par de l'ADN purifié et appliqué le même traitement de précipitation au PEG à l'échantillon de vin. L'ADN viral est bien détecté et le signal est absent lorsqu'un traitement de l'échantillon à la DNase est réalisé avant amplification. Ceci montre que la précipitation au PEG est effective vis-à-vis de particules phagiques et d'ADN viral libre. Nos expériences ne permettent donc pas de savoir à ce stade si le stockage du phage dans le vin génère des particules non infectieuses (ADN encapsidé) ou bien si les capsides sont détruites libérant l'ADN viral dans le milieu. Pour lever l'ambiguïté, les échantillons de vin inoculés par le phage  $\phi$ 19-277 ont subi un traitement à la DNase avant qPCR. Ceci n'a pas fait disparaître le signal, démontrant la persistance de particules non infectieuses dans le vin. Des observations ultérieures en microscopie électronique ont confirmé ce résultat, montrant la présence de particules fortement altérées au niveau de la structure (têtes déformées; absence des parties caudales).

## **5. Stabilité des lysogènes : caractère inducteur du vin**

La transformation progressive du moût en vin est associée à une transformation physico-chimique importante du milieu. Certaines conditions sont susceptibles de provoquer l'excision des prophages chez les bactéries lysogènes naturellement présentes dans le produit. Dans la mesure où nous avons observé un pourcentage élevé de souches lysogènes dans notre panel de souches, il est possible que l'induction de l'excision conduise à une réduction plus ou moins sévère de la flore endogène lors des FML spontanées. Ce phénomène peut aussi agir sur la diversité des souches (par exemple en contre-sélectionnant les souches résistantes aux phages libérés). La connaissance du potentiel inducteur du vin vis-à-vis des souches lysogènes est également essentielle à appréhender dans le contexte de l'inoculation des levains. Nous avons donc évalué l'effet inducteur d'une





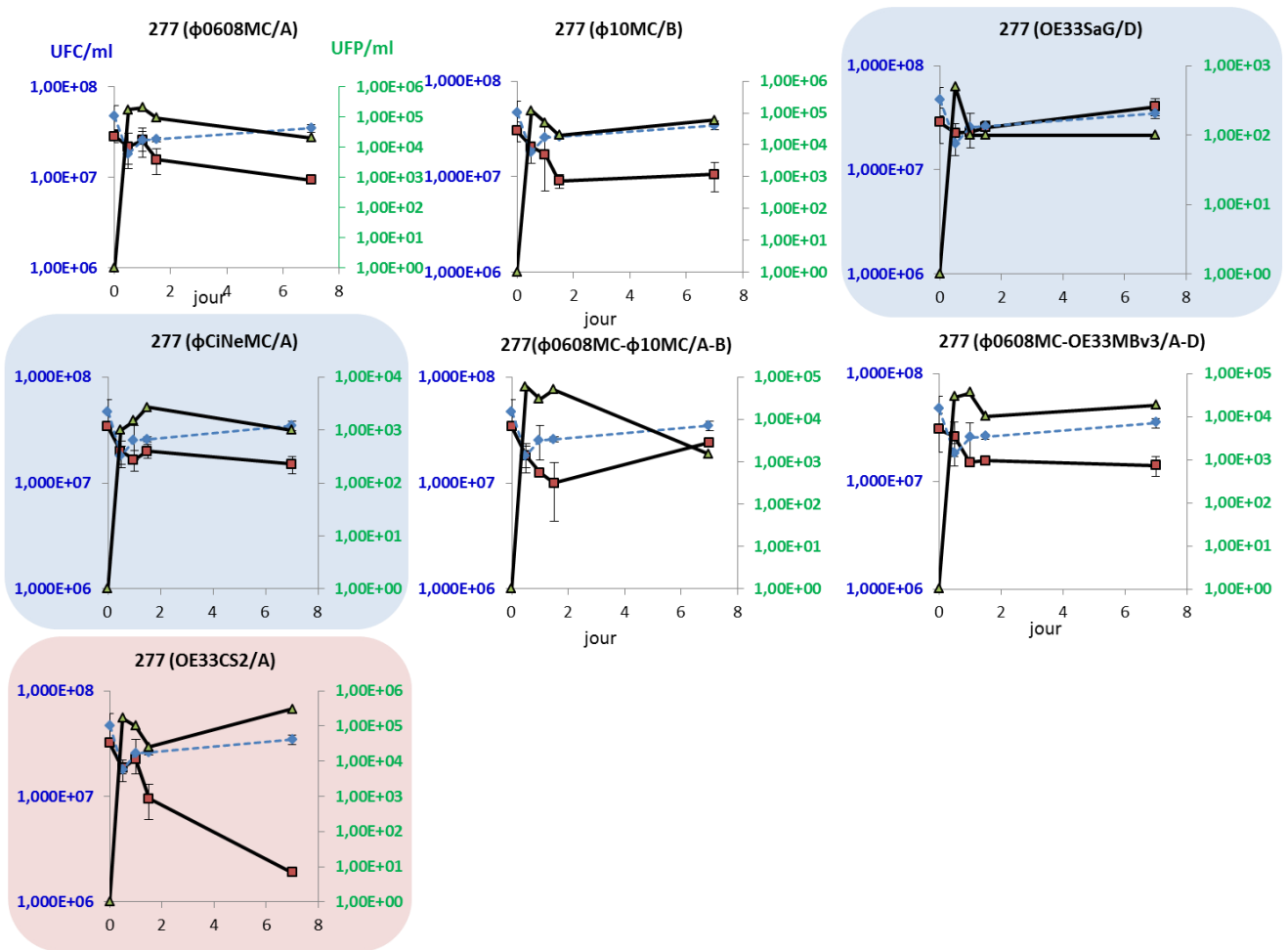
**Figure 60.** Suivi de l'induction des prophages après inoculation des souches lysogènes dans le vin (■), le milieu MRS en présence (■) ou en absence (■) de mitomycine C. Au temps 0, les concentrations en bactéries étaient de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Aucun phage n'était détectable dans le surnageant. Le trait en pointillé indique le seuil de détection.

inoculation de souches lysogènes dans du vin. Nous avons retenu la souche IOEB S277, à partir de laquelle nous avons créé plusieurs variantes mono- ou double-lysogènes à l'aide de phages tempérés choisis dans les groupes A, B et D. Ce choix permet de s'affranchir du contexte génétique de la souche et de son impact possible sur la stabilité de la lysogénie. La stabilité liée à chaque prophage, et l'effet conféré sur l'adaptation de la souche lysogène, peuvent donc être comparés.

### 5.1. Obtention et vérification des clones lysogènes

Plusieurs phages tempérés ont été choisis. Les phages  $\phi 0608MC$ ,  $\phi IOEB CiNeMC$  et OE33CS2 sont tous les trois du groupe A. Les phages  $\phi 10MC$  et OE33SaG/OE33MBv3 appartiennent au groupe B et D, respectivement. Les lysats phagiques correspondants ont été titrés sur la souche permissive IOEB S277. Des plages troubles individualisées ont été repérées et les cellules contenues dans ces plages ont été isolées sur gélose au jus de raisin. Après trois isollements successifs, quelques colonies ont été analysées afin de confirmer leur caractère lysogène. Les ADNs bactériens ont été extraits afin de confirmer la présence du prophage par PCR, à l'aide des amorces définies sur le gène *int* et sur la jonction *attL* spécifiques des prophages A, B ou D. L'absence d'amplicon pour chaque site *attB* a été également vérifiée. Enfin le profil VNTR obtenu pour chaque souche lysogène a été réalisé et la correspondance avec le profil de la souche non lysogène IOEB S277 a été vérifiée.

Cette étape a permis de générer des souches mono-lysogènes pour les phages  $\phi 0608MC$  (A),  $\phi IOEB CiNeMC$  (A), OE33CS2 (A),  $\phi 10MC$  (B) et OE33SaG (D). La souche mono-lysogène contenant le prophage  $\phi 0608MC$  a pu être lysogénisée par un second phage :  $\phi 10MC$  (type B) ou OE33MBv3 (type D). Ceci suggère que l'immunité à la surinfection n'opère pas entre  $\phi 0608MC$  et ces deux phages. Il est intéressant de noter que la combinaison créée (A+B) n'a pas été trouvée lors de l'inventaire des prophages dans les 50 génomes. Les rares souches poly-lysogènes contenaient en effet des associations de type A+C, B+C et A+D. Par ailleurs, nos essais n'ont pas permis l'obtention d'une souche mono-lysogène par le phage OE33MBv3 (type D), alors qu'un protocole similaire a été appliqué.



**Figure 61. Stabilité de souches lysogènes après inoculation dans un vin rouge.**

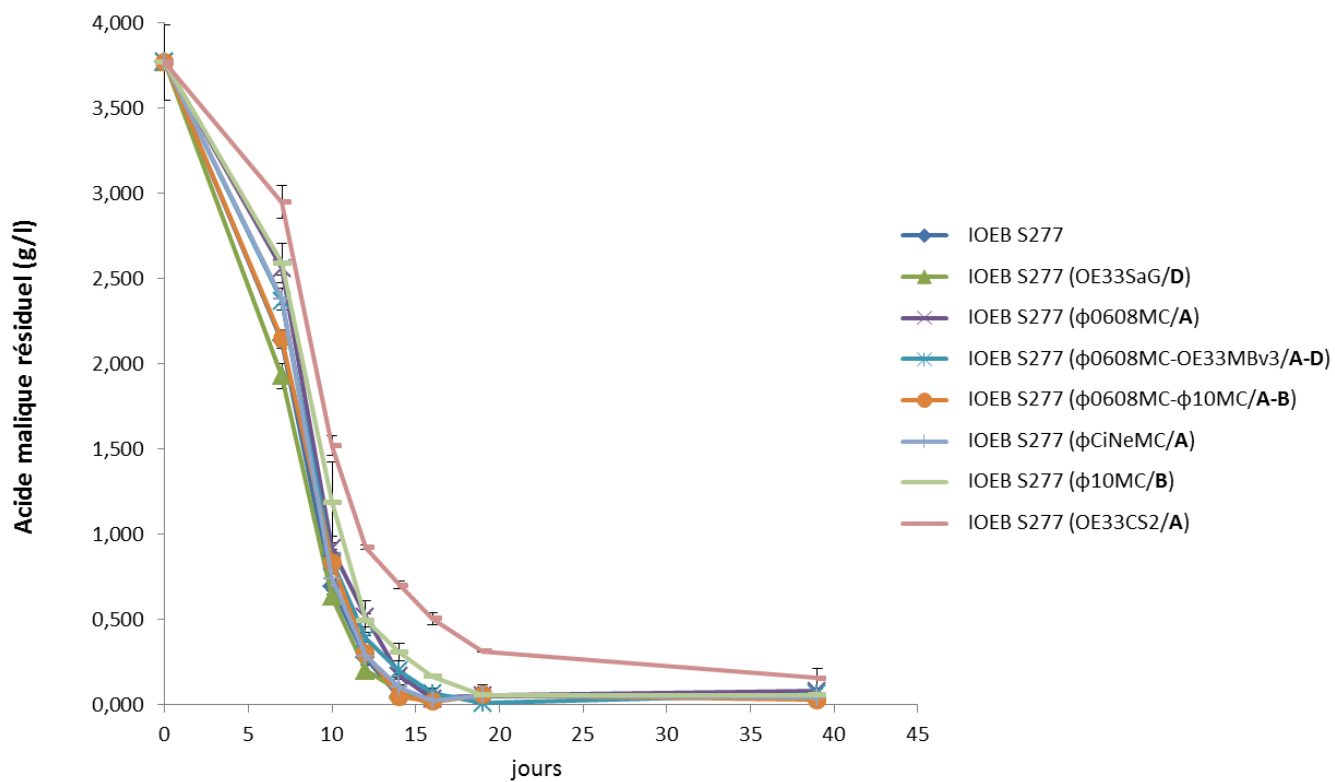
Les souches lysogènes ont été obtenues à partir de la souche IOEB 277. Elles ont été inoculées dans le vin à la concentration initiale de  $5 \times 10^7$  UFC/mL. L'évolution des concentrations en bactéries (■) et en phages libres dans le surnageant (▲) au cours du suivi sont indiquées. Le suivi de population de la souche IOEB 277 non lysogène est également représentée (◆).

**Les quantités de particules libérées spontanément** dans le MRS par les différentes souches isogéniques dans le MRS sont présentées sur la **figure 60**. Les trois souches hébergeant un prophage de type A montrent des taux d'excision variables. Parmi elles, la souche IOEB S277\_φIOEB CiNeMC montre une plus grande stabilité. Son surnageant ne contient aucune particule virale pendant la durée de l'expérience, alors que des concentrations de  $10^3$  UFP/ml et  $10^4$  UFP/ml sont mesurées après 36 h pour les souches lysogènes contenant φ0608MC et OE33CS2. La stabilité de la souche IOEB S277\_φIOEB CiNeMC (A) est surprenante car le phénomène d'absence d'induction spontanée avait été souvent associée aux prophages de type D. IOEB S277\_OE33SaG (D) est d'ailleurs également stable et ne libère pas de phages dans le milieu. La titration du surnageant de culture de la souche IOEB S277\_φ10MC permet de détecter environ  $10^3$  UFP/ml de phages dans le milieu. Concernant les souches lysogènes pour deux prophages, le profil d'induction spontanée est celui du prophage le plus instable.

**Sous l'effet de la MC**, tous les prophages installés chez *O. oeni* IOEB S277 sont induits en milieu MRS. Ceci se traduit par une apparition, ou par une augmentation des particules dans le surnageant. Les niveaux les plus élevés d'induction sont observés pour les lysogènes de type A : IOEB S277\_φIOEB CiNeMC, IOEB S277\_φ0608MC et IOEB S277\_OE33CS2, qui libèrent dans le milieu  $2,9 \times 10^5$  ;  $3,7 \times 10^6$  et  $9 \times 10^6$  UFP/ml, respectivement (**Fig. 60**).

## 5.2. Potentiel inducteur d'une inoculation dans le vin

Les différentes souches lysogènes ont été inoculées dans le vin et deux paramètres ont été suivis: la concentration bactérienne (UFC/mL) et la population virale dans le surnageant (UFP/mL) (**Fig. 61**). Un témoin correspondant à la souche IOEB S277 originale, non lysogène a été réalisé en parallèle. Ce témoin montre une légère chute de la population bactérienne lors de l'inoculation dans le vin, puis la population se stabilise progressivement. Afin de favoriser la survie des souches commerciales lors de l'inoculation dans le vin, il est conseillé de pré-acclimater la souche dans un milieu au jus de raisin dont la teneur en éthanol est ajustée à environ 6 %. Nous n'avons pas réalisé cette étape de pré-acclimatation, ce qui explique la chute initiale observée.



**Figure 62. Evolution de la quantité d'acide malique dans le temps après inoculation de différentes souches lysogènes dans un vin rouge.**

L'inoculation des souches lysogènes dans le vin est également suivie d'une baisse de la concentration en bactéries cultivables. Elle est sensiblement plus importante que celle de la souche témoin, et est proche de 0,5 unités  $\log_{10}$  après 36 h. La souche lysogène pour le phage OE33CS2 est moins stable, et la valeur atteint 1 unité  $\log_{10}$ . Afin de corrélérer la baisse de la population bactérienne avec un phénomène d'induction, la population virale a été mesurée en parallèle dans le surnageant. Elle augmente entre les temps 0 et 12 h et reste stable par la suite. Les concentrations détectées pour les différents phages dans le vin sont comprises entre  $10^3$  et  $10^5$  UFP/ml et ceci pendant 8 jours (**Fig. 61**). Cette stabilité apparente des populations virales est surprenante car nous avons montré précédemment que les phages perdaient rapidement leur potentiel infectieux et leur capacité à former des plages de lyse dans le vin à température ambiante. Il est donc probable que la quantité de phages mesurée soit l'expression de deux mécanismes antagonistes: d'une part une augmentation de la concentration liée à l'excision du prophage (et suivie d'un cycle lytique), et d'autre part une inactivation des particules liée à la composition du vin.

Trois souches sont particulièrement intéressantes. Il s'agit tout d'abord des souches IOEB S277\_OE33SaG (D) et IOEB S277\_ϕIOEB CiNeMC (A) qui libèrent moins de phages dans le vin que les autres ( $\sim 10^2$  à  $10^3$  UFP/ml). En accord avec cette observation, la population bactérienne est proche (IOEB S277\_ϕIOEB CiNeMC) ou identique (IOEB S277\_OE33SaG) à celle observée pour la souche non lysogène. A l'opposé, la présence du phage OE33CS2 apporte une forte instabilité à la souche et se traduit par une chute plus importante de la population bactérienne.

Afin de compléter l'expérience, la quantité d'acide malique résiduelle a été mesurée dans le milieu afin de renseigner sur le déroulement de la FML dans les essais (**Fig. 62**). On observe peu ou pas de différence entre les souches concernant la concentration finale en acide malique. Toutefois, on peut voir un léger avantage de la souche IOEB S277\_OE33SaG qui au bout d'une semaine a dégradé la moitié de la quantité d'acide malique initialement présente. En accord avec la chute brusque de la population bactérienne de la souche IOEB S277\_OE33CS2, on observe un léger retard dans la dégradation de l'acide malique. La prolongation du suivi a montré que la FML était achevée ( $< 0,1$  g/l) dans tous les essais après un maximum de 18 jours, tandis que la condition inoculée avec la souche IOEB S277\_OE33CS2 contenait toujours de l'acide malique ( $\sim 0,2$  g/l) après 39 jours d'incubation.



## 6. Conclusion du chapitre III

**Les oenophages ne sont pas seulement des phages tempérés obligatoires** comme ce qui est souvent décrit dans la littérature. La présence de phages lytiques avait déjà été évoquée lors des essais d'induction à la MC. Nous confirmons l'émergence de phages lytiques dans le vin, dérivant de phages tempérés. Pour la première fois, la virulence d'un oenophage a été évaluée. Le cycle viral dure dix heures et chaque cellule infectée libère 45 virions.

**La multiplication des oenophages** est observée dans le jus de raisin, même si elle est moins importante que dans le MRS. Nous avons montré l'importance de la température sur le choix lyse/lysogénie des phages. La capacité de multiplication des virus dans le vin en fin de FA reste hypothétique. Il est probable qu'elle est limitée par la présence d'acides, et de composés comme les polyphénols.

**Dans l'environnement, les particules ont des niveaux de persistance variables.** L'acidité est un composant majeur de l'inhibition des particules virales. La température potentialise l'inactivation des oenophages dans le vin. La diversité des niveaux de persistance est en accord avec la diversité génétique mise en évidence. On peut imaginer que la diversité de la tolérance des phages vis-à-vis du milieu est susceptible d'entraîner une certaine dynamique de la population d'oenophages, qu'il convient d'intégrer dans le continuum raisin-moût-vin. Une recherche de phages infectant l'espèce dans des milieux moins agressifs tels que le cidre permettrait de compléter nos connaissances sur la diversité des oenophages. La dynamique des phages est un outil complémentaire pour comprendre la dynamique de l'hôte (Switt *et al.*, 2013).

**Le vin altère les phages de façon irréversible.** L'utilisation de la technique de la double-couche pour dénombrer les phages en fin de vinification (c'est-à-dire dans le vin) permet d'accéder à la population infectieuse. Si il y a eu infection auparavant pendant le procédé, les particules seront présentes, mais dans un état non infectieux dans le produit final. C'est ce que montrent nos expériences de qPCR. Un résultat négatif sera obtenu par la double-couche, et il ne renseigne absolument pas sur la dynamique qui a précédé. A l'inverse, l'outil qPCR seul, ne peut permettre d'estimer le risque phage dans la fermentation.





Nous avons montré que **l'inoculation directe de souches lysogènes dans le vin, conduit à l'excision du prophage**, et entraîne la mortalité d'une fraction de la population bactérienne. De plus, nos tests de persistance dans le vin, ont montré que la cinétique d'inactivation des phages dans le milieu se déroule sur une période inférieure à 4 jours. La présence de phages après une période d'une semaine dans nos essais, indiquent clairement que les souches continuent de libérer du phage dans le milieu. Toutefois, le suivi de la dégradation de l'acide malique montre que malgré une induction des prophages dans une fraction de la population, l'activité bactérienne est peu, ou pas, affectée par ce phénomène. On note même dans le cas de la souche IOEB S277\_OE33SaG (D) une croissance comparable, voire supérieure, à celle de la souche sauvage. L'hypothèse de l'acquisition de facteurs de fitness *via* le prophage est une piste à explorer.

**Du point de vue industriel**, nous avons montré que les phages se multiplient dans les milieux utilisés pour la production de levains. L'utilisation de levains lysogènes dans l'enceinte peut conduire à des problèmes d'infection de souches non lysogènes. L'émergence de phages lytiques est possible. Selon Torriani *et al.* (2011) la résistance aux bactériophages fait partie des différents critères de sélection d'un levain malolactique. L'application de ce critère a peut être mené à l'isolement de souches commerciales lysogènes. Par ailleurs, l'utilisation de levains lysogènes crée une étape de lyse à l'inoculation, dont l'importance est fonction de la nature du prophage intégré.



## **Chapitre IV**

### **Résistance aux phages et co-évolution phage-hôte**



Les mécanismes de résistance aux bactériophages dans l'espèce *O. oeni* sont peu documentés. Aucun système CRISPR-Cas n'a été détecté dans les génomes de *O. oeni*. Cependant, les données présentées dans les chapitres précédents suggèrent la présence de mécanismes de défense chez les prophages de *O. oeni*, ainsi que sur certains îlots génomiques. Il s'agit de protéines Abi-like, Sie et de systèmes RM (Restriction-Modification) putatifs. La présence de systèmes RM a souvent été suspectée dans l'espèce *O. oeni*, et proposée comme une explication aux difficultés rencontrées pour transformer la souche (Assad-García *et al.*, 2008).

Chez les BL, la variabilité de la résistance aux phages au sein d'une espèce peut être également modulée par la perte ou la modification des récepteurs pariétaux sous la pression des phages présents dans l'environnement. Le phénomène est exploité dans l'industrie afin de sélectionner des mutants de paroi résistants aux phages, et il s'adresse notamment aux bactéries lactiques ne possédant pas de système CRISPR dans le génome cœur, comme *Lc. lactis* (Millen *et al.*, 2012).

Ce chapitre aborde quelques aspects de la résistance aux phages. Dans un premier temps, les spectres de sensibilité des souches ont tout d'abord été déterminés vis-à-vis des phages isolés de l'environnement œnologique, ou obtenus après induction de souches lysogènes. Dans l'optique de renseigner sur la nature des récepteurs des œnophages, ces profils ont été comparés avec les capacités de biosynthèse d'exopolysaccharides (Eps) décrites récemment chez les souches testées (Dimopoulou *et al.*, 2014). Nous avons ensuite rapidement évalué la possibilité d'intervention d'un mécanisme RM chez la souche IOEB 0608. Une dernière partie aborde l'isolement de BIMs ("Bacteriophage insensitive mutant") à partir de la souche permissive IOEB S277. Les premières analyses orientent vers l'acquisition d'une mutation inhibant les capacités d'adsorption des phages sur la paroi.

**Tableau XX. Spectre de résistance d'un ensemble de 34 souches de *O. oeni*.**

Souches		Groupe MLST	Type A	Type C	Type B	Type D	S / $\phi$ <sup>a</sup>	Niveau de sensibilité <sup>b</sup>
IOEB 0502	B						0/27	
ATCC BAA-1163	B						0/27	
S13	B						0/27	
IOEB C23	B						0/17	
IOEB 0501	B						0/27	
IOEB 9304	B						0/17	
IOEB 9803	B						0/27	
IOEB 9805	B						0/27	
IOEB 8417	B						0/27	
L181*	B						0/17	
ExpC*	B						0/17	
AWRIB429	A						12/17	
IOEB 0608	A						18/23	
S11	A						3/27	
IOEB CiNe	A						0/14	
S28	A						7/17	
IOEB 9517	A						11/20	
IOEB L65_2	A						0/14	
IOEB S450	A						4/17	
IOEB B10	A						0/27	
IOEB S277	A						40/40	
Sarco 15	A						9/17	
Sarco 161	A						4/17	
Vitilactic F	A						0/17	
PSU-1	A						0/27	
Sarco 14	A						0/17	
IOEB B16	A						0/17	
IOEB 0205	A						0/17	
Sarco 25	A						21/23	
IOEB 0607	A						0/17	
IOEB C52	C						2/12	
MC1*	A						0/17	
S51*	ND						7/17	
B1*	ND						0/17	

\*Souche dont le génome n'est pas disponible et dont le statut lysogène a été déterminé par PCR.

<sup>a</sup> nombre de lysats phagiques formant des plages sur la souche ; <sup>b</sup> les souches résistantes à tous les phages testés sont en rouge ; les souches sensibles à la majorité des phages testées sont en bleu et les souches à spectre intermédiaire sont en rose.

## 1. Spectre d'hôte des phages isolés

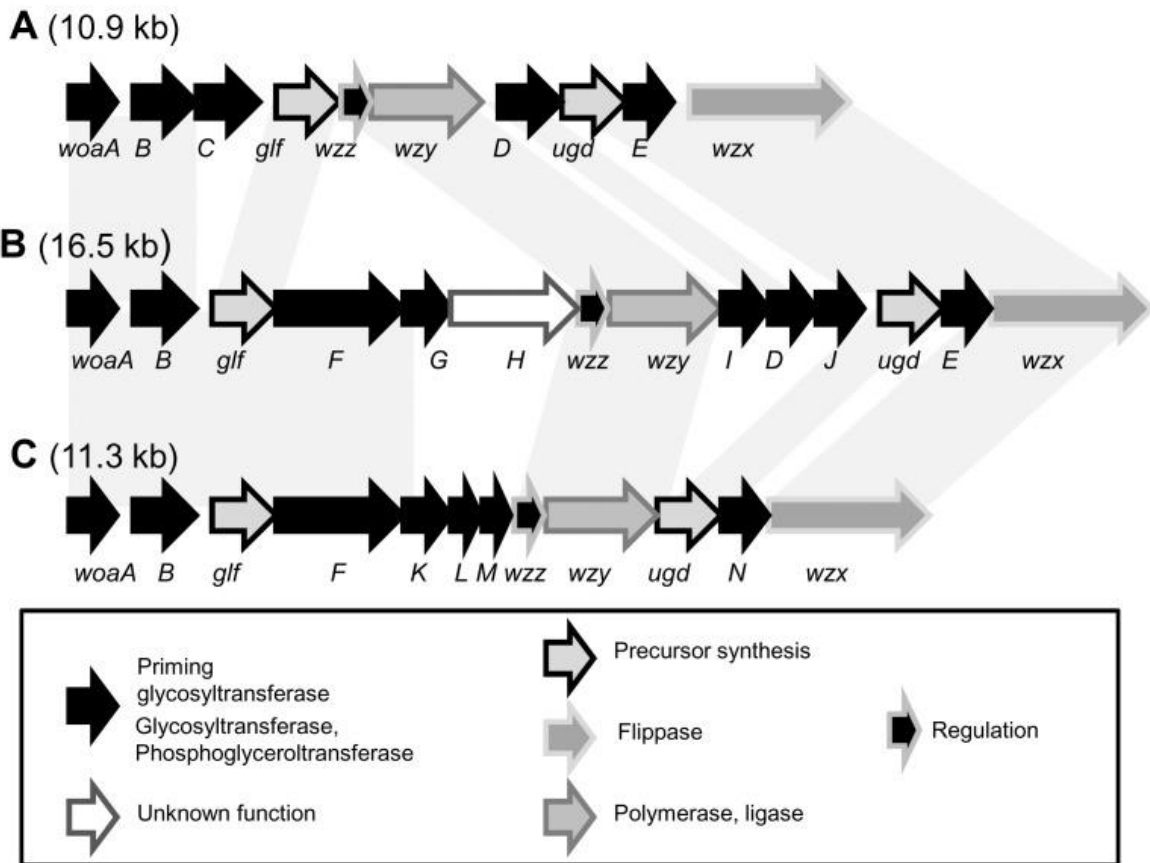
La sensibilité de 34 souches a été testée vis-à-vis des phages isolés des vins, ou obtenus après induction des souches lysogènes. Les résultats sont consignés dans le **Tableau XX**. Au total, 35 % des souches ont montré une inhibition par au moins un oenophage. Nous avons classé les souches en deux catégories, selon l'aptitude des phages, ou non, à former des plages de lyse sur les tapis bactériens correspondants. Les deux catégories sont les suivantes :

- une première classe de souches résistantes. Aucun des oenophages testés n'a produit une quelconque inhibition de la croissance de ces souches. L'absence de plages a été vérifiée en présence de lysats concentrés, testés purs ( $10^8$  -  $10^9$  UFP/mL). Toutes les souches du groupe phylogénétique B sont résistantes. Un peu moins de la moitié des souches du groupe A (11/23) sont également résistantes.

- la deuxième catégorie rassemble les souches sensibles à au moins un phage :
  - les souches permissives ont une EOP (« efficiency of plating ») proche de 1, et ceci vis-à-vis de la majorité des phages testés. Le groupe comporte les souches *O. oeni* S25, IOEB S277, S15, IOEB 9517, IOEB 0608 et AWRIB429. Il est à noter que la souche IOEB 0608 a une sensibilité moindre vis-à-vis du phage  $\phi$ 19-277 par rapport aux autres phages actifs sur la souche. Toutes les souches dites permissives appartiennent au groupe A. Les souches IOEB S277 et S15 sont génétiquement très proches.
  - quelques souches ont une résistance classée d'intermédiaire (**Tab. XX**). Elles sont sensibles à un nombre limité de phages, ne dépassant pas 50 % des oenophages testés.

La présence de souches sensibles indique que la première étape du cycle lytique des phages est effective et que les récepteurs sont présents, et accessibles. Chez les BL, l'adsorption des phages sur l'enveloppe débute par une étape réversible d'adsorption du phage sur des glycopolymères pariétaux. Puis elle est suivie d'une interaction irréversible avec le même récepteur, ou sur un autre composé de surface (Chapot-Chartier, 2014). Dans le but d'identifier la nature du récepteur aux oenophages, nous avons confronté nos





**Figure 63. Schéma des structures associées au cluster 1 (A, B et C) et dirigeant la synthèse d'un composé Eps chez *O. oeni* d'après Dimopoulou *et al.* (2014). Les souches sensibles aux phages ont l'organisation génétique B.**

résultats avec les données récentes de distribution des gènes codant les Eps chez *O. oeni*, montrant l'existence de deux clusters *eps1* et *eps2* (Dimopoulou *et al.*, 2014).

Les souches sensibles aux phages contiennent le cluster nommé *eps1*, qui dirige la synthèse d'un composé minoritaire, non capsulaire (**Fig. 63**). Parmi les trois types d'organisation du cluster, c'est le modèle B qui est présent chez les souches sensibles. Par rapport aux modèles A et C, il présente un gène supplémentaire dont le rôle est inconnu. Selon Dimopoulou *et al.* (2014), *eps1* pourrait diriger la synthèse d'un polymère ancré dans la membrane, proche de la structure des lipopolysaccharides de bactéries à Gram<sup>-</sup>. Le rôle du second cluster, *eps2* serait probablement de "décorer" ce polymère.

Chez les BL, les récepteurs aux phages correspondent à des polysaccharides pariétaux. Pour *Lc. lactis*, une structure nommée C2 est le déterminant majeur de la sensibilité des souches aux phages (Ainsworth *et al.*, 2014). Sa structure correspond à des unités répétées de nature penta-saccharidique, liées par des ponts phospho-diester, dont la structure est 6- $\alpha$ -Glc-3- $\beta$ -Gal-3- $\beta$ -GlcNac-2- $\beta$ -Gal-6- $\alpha$ -GlcNac-1-P (Ainsworth *et al.*, 2014). Chez certains lactobacilles, les récepteurs sont des acides lipotéchoïques, et des substitutions subtiles de motifs D-Ala ou  $\alpha$ -Glc affectent l'adsorption du phage LL-H sur son hôte *Lb. delbrueckii* (Munsch-Alatossava & Alatossava, 2013). L'identification des récepteurs chez *O. oeni* est une tâche complexe, et l'utilisation de « lectin-arrays » telle que celle développée par Yasuda *et al.* (2011) chez *Lb. casei* pourrait apporter des éléments intéressants.

## 2. Immunité à la surinfection chez *O. oeni*

L'analyse des spectres ne montre pas de corrélation particulière entre la résistance d'une souche donnée à un phage, et son contenu prophagique. Ceci peut être lié à la diversité génétique des souches, qui peuvent posséder des panels de mécanismes de résistance divers et complémentaires. Dans ce schéma, la répression assurée par la protéine ci-like du prophage (ou immunité à la surinfection) ne serait donc pas le seul mécanisme de résistance opérationnel dans la cellule infectée.

**Tableau XXI. Spectre de résistance de trois souches lysogènes obtenues à partir de la souche sensible IOEB S277.**

		IOEB S277 (OE33CS2)	IOEB S277 ( $\phi$ 0608MC)	IOEB S277 ( $\phi$ 10MC)
<b>Type D</b>	OE33SM	+	+	+
	OE33SeG	+	+	+
	OE33MBv3	+	+	+
	OE33MBc1	+	+	+
	OE33SaG	+	+	+
<b>Type A</b>	OE33MC1	+	+	
	OE33MBv1	ImS	+	
	OE33CS2	ImS	+	non ImS
	OE33XP	+	+	+
	$\phi$ 0608MC	+	ImS	
<b>Type B</b>	$\phi$ 19-277	+	+	
	OE33CF1	+	+	
	OE33MBc4	+	+	
	OE33CF4	+	+	
	OE33CF4	+	+	
	OE33MBc5	+	+	
	$\phi$ 10MC	+	+	ImS

Les EOP sont  $< 10^{-6}$  pour les souches représentées en rouge. La sensibilité est observée *via* la présence de plages de lyse sur la souche (+). L'immunité à la surinfection par le même phage est appelée ImS (immunité à la Surinfection).

Afin de s'affranchir de ce possible phénomène et mieux mettre en évidence l'action du mécanisme d'immunité, nous avons testé le spectre des phages sur la souche sensible IOEB S277, et sur des dérivés lysogènes de cette même souche.

### 2.1. Immunité conférée par le prophage $\phi$ 10MC (B)

La souche IOEB S277 a été infectée par le phage tempéré  $\phi$ 10MC de type B. Un clone lysogène stable a été isolé à partir d'une plaque trouble formée par le phage. La souche lysogène nommée IOEB S277 ( $\phi$ 10MC), a été (sur)infectée par  $\phi$ 10MC. Comme attendu, la souche s'est révélée immune à son prophage  $\phi$ 10MC (EOP <  $1 \times 10^{-6}$ ). Elle a montré également une résistance croisée vis-à-vis de six autres phages de type B, dont  $\phi$ 19-277 (EOP également <  $1 \times 10^{-6}$ ), et également de trois phages de type A (**Tab. XXI**). Un seul phage de type A n'a pas été bloqué par la souche lysogène IOEB S277 ( $\phi$ 10MC). Il s'agit de OE33XP, isolé du vin en échec de FML lors de la fermentation menée à l'ISVV et dont le génome ne correspond à aucune des combinaisons identifiées chez les prophages de type A. Il est possible que la souche IOEB S277 ( $\phi$ 10MC) résiste à l'infection par les autres phages de type B *via* un mécanisme dépendant du répresseur phagique. Ceci suggère que les phages B sont homo-immuns et possèdent la même région d'immunité dans leur génome. Toutefois, l'analyse du module d'intégration pour les trois prophages de type B dont les séquences sont disponibles (IOEB B10\_B, IOEB C23\_B et AWRIB202\_B) ne va pas dans ce sens. Aucune protéine conservée présentant des motifs de fixation à l'ADN n'est identifiée dans cette région.

Une autre hypothèse est que le génome de  $\phi$ 10MC dirige la synthèse d'un composé apportant à la souche lysogène une résistance au phage  $\phi$ 19-277. Il pourrait s'agir d'un système de type Sie (« Superinfection exclusion system »). Ce type de mécanisme est porté par un prophage, et est décrit chez des bactéries à Gram<sup>-</sup> comme à Gram<sup>+</sup>. Sie empêche l'infection de la bactérie lysogène par un autre phage en masquant les facteurs de l'hôte requis lors de l'injection de l'ADN viral, ou *via* une interaction directe avec un élément structural du phage adsorbé, comme la protéine Tmp (tape measure protein) (Donnelly-Wu *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2006; Cumby *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014). Chez les BL, des gènes *sie* ont été identifiés au sein de prophages chez *Lc lactis* (McGrath *et al.*, 2002; Mahony *et al.*,



2008), et *S. thermophilus* (Sun *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2014), où ils sont exprimés de manière constitutive. Les phages Tuc2009 et TP-J34L qui infectent *Lc. lactis* et *S. thermophilus*, respectivement, sont insensibles à leur propre mécanisme Sie (McGrath *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006). Cependant, des systèmes différents montrent des efficacités très différentes selon le phage et les protéines Sie impliqués (Sun *et al.*, 2006). Les gènes sont localisés dans le module de lysogénie pour *S. thermophilus* et *Lc. lactis*. Chez *E. coli*, le gène *sie* du prophage HK97 est près du gène *tmp* (Cumby *et al.*, 2012). Dans le cas de nos oenophages de type D, des gènes *sie*-like sont localisés sur le module distal. L'analyse du génome viral de  $\phi$ 10MC à partir des données de la souche lysogène IOEB B10 ne révèle pas de protéines ayant une homologie avec ces protéines Sie. Toutefois, il n'y a pas de conservation protéique dans la famille Sie, hormis la présence d'un domaine transmembranaire (Labrie *et al.*, 2010). La famille Sie rassemble des protéines ancrées sur la face externe de la membrane cytoplasmique *via* une hélice membranaire N-terminale (Mahony *et al.*, 2008; Cumby *et al.*, 2012) ou bien un ancrage lipidique (Sun *et al.*, 2006). L'exception serait la protéine glo de *Vibrio cholerae*, qui est décrite comme étant une protéine soluble périplasmique (Nesper *et al.*, 1999).




## 2.2. Souches lysogènes pour des prophages de type A

La démarche précédente a été réalisée avec deux souches lysogènes pour un phage de type A ( $\phi$ 0608MC et OE33CS2), respectivement (**Tab. XXI**). Chaque souche lysogène est bien résistante au phage libre ayant servi à la lysogéniser. Nous avons observé que la présence du prophage  $\phi$ 0608MC (type A) ne protège pas la souche vis-à-vis des autres phages testés de groupe A, B et D.

La seconde souche lysogène testée IOEB S277 (OE33CS2) montre une protection croisée vis-à-vis du phage OE33MBv1, qui est également de type A. Ceci peut conforter les résultats précédents montrant des profils similaires entre les deux phages OE33CS2 et OE33MBv1 (Chapitre II). Le développement des phages D n'est pas affecté dans les deux lysogènes.

**Tableau XXII. Mise en évidence d'un système RM chez *O. oeni* IOEB 0608.**

Souche (et présence de <i>LlaGI</i> )	IOEB S277	IOEB 0608 <i>LlaGI</i> +	IOEB S277 ( $\phi$ 0608MC)	S28 <i>LlaGI</i> +
Stock 1 $\phi$ 19-277 (IOEB S277)	1	$7 \times 10^{-6}$	1	$<7,7 \times 10^{-7}$
Stock 2 $\phi$ 19-277 (IOEB S277) (IOEB 0608)	20	1	1	$\sim 1,2 \times 10^{-2}$
Stock 3 $\phi$ 19-277 (IOEB S277) (IOEB 0608) (IOEB S277)	1	$1,42 \times 10^{-3}$	<i>nd</i>	$\sim 4,7 \times 10^{-5}$

	EOP < $10^{-6}$ très résistante
	$10^{-6}$ < EOP < $10^{-3}$ résistance intermédiaire
	EOP $\sim 1$ souche permissive

L'ensemble des expériences montrent que le prophage  $\phi$ 10MC bloque le phage surinfectant OE33CS2, alors que le prophage OE33CS2 ne bloque pas le phage surinfectant  $\phi$ 10MC. Les deux phages  $\phi$ 10MC et OE33CS2 ne sont pas homo-immuns. La résistance conférée par la souche IOEB S277 ( $\phi$ 10MC) vis-à-vis du phage OE33CS2 n'est pas conférée par un mécanisme d'immunité à la surinfection mais par un mécanisme autre, comme suggéré précédemment. Ceci oriente à nouveau vers la piste d'une présence de mécanisme de résistance chez le phage  $\phi$ 10MC.

### 3. Cas particulier de la résistance exercée par la souche IOEB 0608 vis-à-vis de $\phi$ 19-277

Des plages de lyse ont été observées sur la souche IOEB 0608 en présence d'une suspension concentrée ( $\sim 10^8$  UFP/ml) du phage  $\phi$ 19-277. Ce stock (nommé 1) avait été produit au préalable sur la souche IOEB S277. Les plages obtenues ont montré un aspect trouble et une petite taille, ce qui ne correspond pas à la morphologie des plages observées chez *O. oeni* IOEB S277 (claires ;  $> 7$  mm). La valeur de l'EOP est proche de  $10^{-6}$ .

Une plage de lyse de morphologie anormale a été excisée avec précaution, et les particules virales ont été mises en suspension dans du milieu MRS $\phi$ . Le lysat obtenu a été à nouveau propagé sur la souche IOEB 0608 en milieu solide, afin de disposer d'un lysat concentré. Les gélouses molles ont été rassemblées et centrifugées. L'opération a été réalisée une seconde fois. La suspension obtenue a été nommée  $\phi$ 19-277 (IOEB 0608), ou stock 2. Les titrations des stocks 1 et 2 ont été évaluées en parallèle sur trois souches : IOEB 0608, IOEB S277 et la souche lysogène IOEB S277 ( $\phi$ 0608MC) (**Tab. XXII**).

- Lorsque le stock 1 est titré sur la souche IOEB 0608, quelques plages sont observées alors que le développement est normal sur les souches IOEB S277 et IOEB S277 ( $\phi$ 0608MC). Ces données suggèrent que (i) *la souche IOEB 0608 a un système de résistance qui peut être contourné, ou dépassé, par quelques particules virales*; et (ii) *le système est lié à la souche, et non à son prophage*.





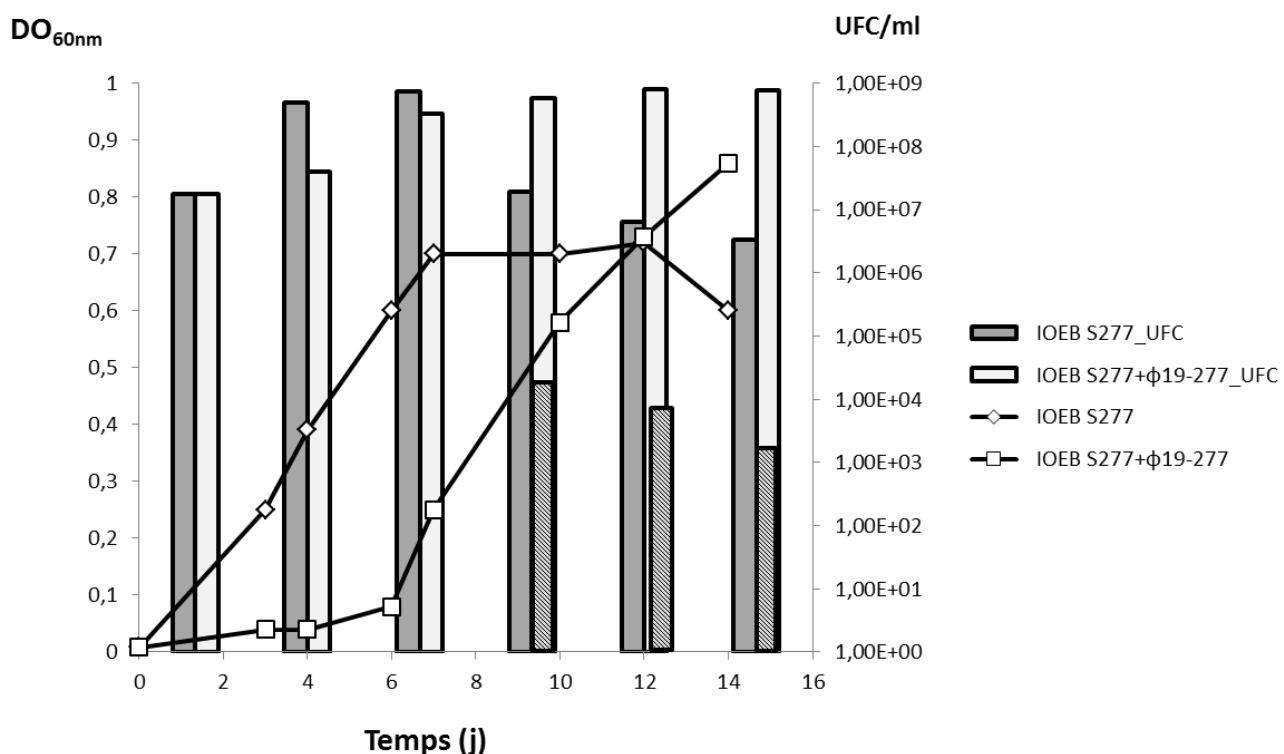
- Le stock 2 est obtenu après propagation du phage  $\phi$ 19-277 sur *O. oeni* IOEB 0608. Lorsqu'il est titré sur les deux souches IOEB S277 ( $\phi$ 0608MC) et IOEB 0608, il n'y a plus de différence d'EOP entre les deux valeurs, comme observé précédemment. *Le fait que le phage se soit propagé une première fois sur la souche IOEB 0608, lui permet d'infecter plus efficacement la souche lors d'une deuxième rencontre.*

Les expériences suggèrent que la multiplication du phage  $\phi$ 19-277 sur la souche IOEB 0608 modifie le phage, *par méthylation de son ADN* grâce à un éventuel système RM abrité chez *O. oeni* IOEB 0608 ; ou bien *suite à des échanges génétiques entre  $\phi$ 19-277 et le prophage résident de la souche IOEB 0608, générant un « phage hybride ».*

Dans le premier cas, la modification du phage n'est pas permanente. Si le stock 2 est à nouveau propagé sur la souche IOEB S277 (création d'un stock 3), l'ADN viral perdra sa méthylation. Les phages du stock 3 auront donc à nouveau plus de difficultés à se propager sur la souche IOEB 0608 par rapport à IOEB S277. Dans l'autre cas (phage « hybride »), il n'y a pas de modification d'EOP entre les stocks 2 et 3.

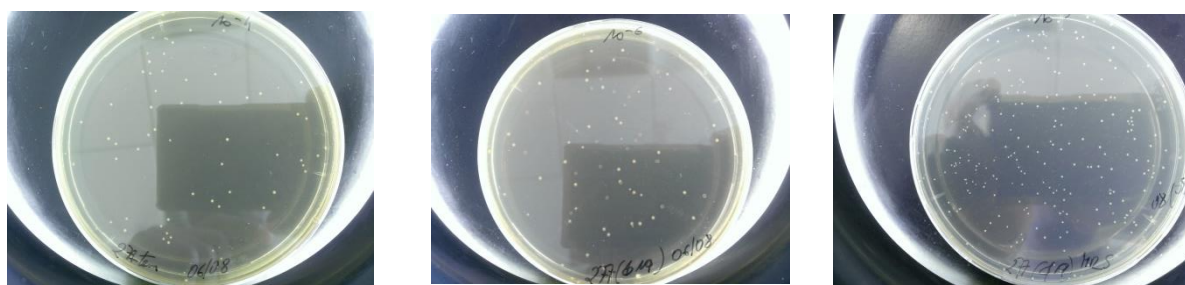
Le test du stock 3 a montré une EOP de  $10^{-3}$  sur la souche IOEB 0608 (**Tab. XXII**). La souche IOEB 0608 semble donc avoir un système RM. La différence entre les EOP observées entre les stocks 1 et 3 suggère la présence d'autres mécanismes. Ceci est également suggéré par le fait que le phage contenu dans le stock 2, et dont l'ADN est méthylé, a une EOP de 20 sur la souche IOEB S277.

L'identification du RM chez *O. oeni* reste à réaliser. Il pourrait correspondre au système RM *LlaGI* porté sur l'ilôt mobile  $I_2$ . Le gène est également chez les souches IOEB CiNe, IOEB L65-2, S11, S28 et IOEB 9517. Les résultats préliminaires sont que les souches IOEB CiNe, IOEB L65-2 et S11 ne propagent pas le phage  $\phi$ 19-277 contenu dans les stocks 1 et 2. Il peut être proposé qu'elles possèdent d'autres mécanismes de résistance au phage. La souche S28 montre le même profil de réponse que la souche IOEB 0608. La présence du RM serait associée à la même valeur d'EOP de  $10^{-3}$ . La souche disposerait par ailleurs d'un autre (d'autres) mécanisme (s) de résistance, car malgré la méthylation de l'ADN viral obtenue dans le stock 2, la souche est toujours capable de bloquer une partie du développement viral.



**Figure 64. Evolution des populations bactériennes et virales lors de l'infection prolongée de la souche IOEB S277 par le phage virulent  $\phi$ 19-277.**

Les courbes montrent l'évolution de l'absorbance en absence ( $\diamond$ ) et en présence ( $\square$ ) du phage. Les numérations (UFC/mL) des échantillons témoins et infectés sont représentées par des histogrammes de couleur gris foncé, et gris clair, respectivement. La proportion de colonies rouges par rapport à la population totale, est représentée par un histogramme hachuré.



**Figure 65. Aspect hétérogène des colonies isolées d'une culture de *O. oeni* IOEB S277 infectée par le phage  $\phi$ 19-277 lorsque la numération est réalisée sur gélose au jus de raisin.**

## 4. Isolement de BIMs

L'activité strictement lytique du phage  $\phi$ 19-277 ne conduit pas à l'obtention de clones lysogènes lors de l'infection de la souche IOEB S277. L'apparition de bactéries résistantes au phage a été observée (Chapitre III). Nous avons reproduit le protocole d'obtention de ces souches appelées BIMs (Bacteriophage insensitive mutants ou "BIM") à partir de la souche permissive IOEB S277. Le phage  $\phi$ 19-277 a été utilisé pour l'obtention de telles souches à partir de la souche IOEB S277. Le suivi d'une infection d'une culture liquide de la souche IOEB S277 avec  $\phi$ 19-277 est présenté sur la **figure 64**. Nous avons ensuite caractérisé les bactéries résistantes isolées.

### 4.1. Obtention des BIMs

La culture infectée par le phage  $\phi$ 19-277 ne présente aucun signe apparent de croissance durant les premiers jours de l'infection, alors que le témoin non infecté entame rapidement sa croissance. Toutefois, à partir d'une semaine la culture infectée présente un trouble qui correspond à une reprise de croissance cellulaire. Elle est confirmée par la numération des bactéries présentes dans l'échantillon infecté sur gélose MRS (**Fig. 64**).

Les bactéries ont été dénombrées en parallèle sur gélose MRS et gélose jus de raisin. Lorsque la numération est réalisée sur gélose au jus de raisin, on observe une hétérogénéité des colonies au sein de la population (**Fig. 65**). Il s'agit de colonies présentant une pigmentation rouge, représentant une proportion variable de la population totale (30 à 50 % d'une population totale de  $5,9 \times 10^8$  UFC/mL). Les éléments suivants ont été relevés :

- il n'existe pas de liens directs entre le stade du suivi et le pourcentage de colonies rouges ;
- les colonies rouges ne sont jamais retrouvées lors des numérations sur gélose MRS, et leur présence est donc spécifique de la gélose au jus de raisin ;

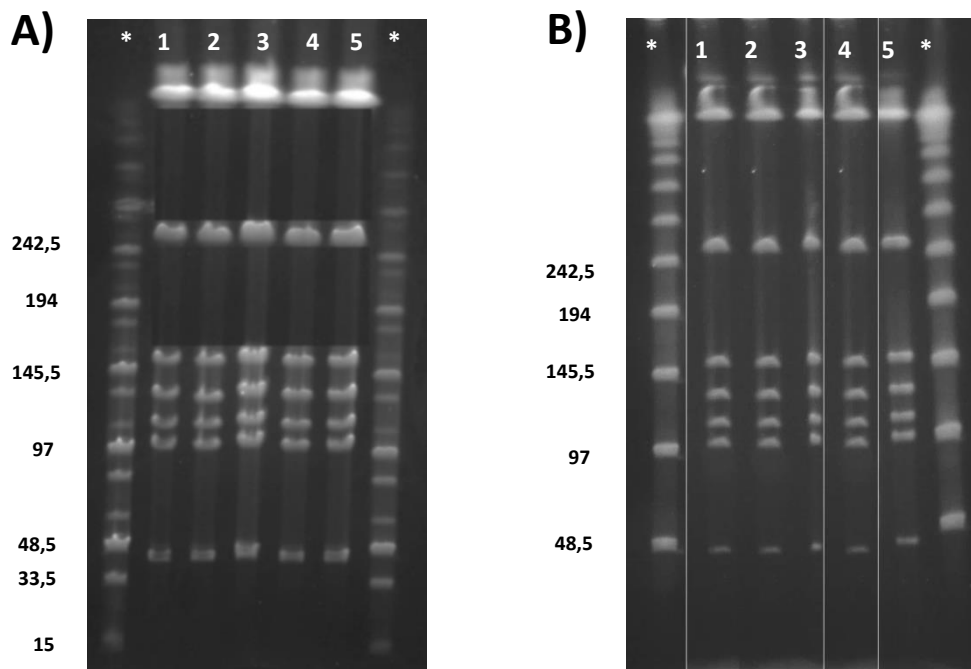
**Tableau XXIII. Spectre de résistance de quatre clones BIMs obtenus à partir de la souche IOEB S277 en présence de plusieurs phages.**

Groupe	Phages	IOEB S277	BIM1	BIM2	BIM3	BIM4
A	OE33XP					
	φ0608MC					
	OE33MC1					
	OE33CS2					
B	φ19-277	*	*	*	*	*
	φ10MC					
	OE33CF1					
D	OE33SaG					
	OE33SeG					
	OE33SM					
	OE33MBc1					

Légende :

- EOP < 10<sup>-6</sup> très résistante
- 10<sup>-6</sup> < EOP < 10<sup>-3</sup> résistance intermédiaire
- EOP ~ 1 souche permissive

\* : résultats de sensibilité vis-à-vis du phage φ19-277 utilisé dans le challenge.



**Figure 66. Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé des BIMs et de la souche parentale *O. oeni* IOEB S277.**

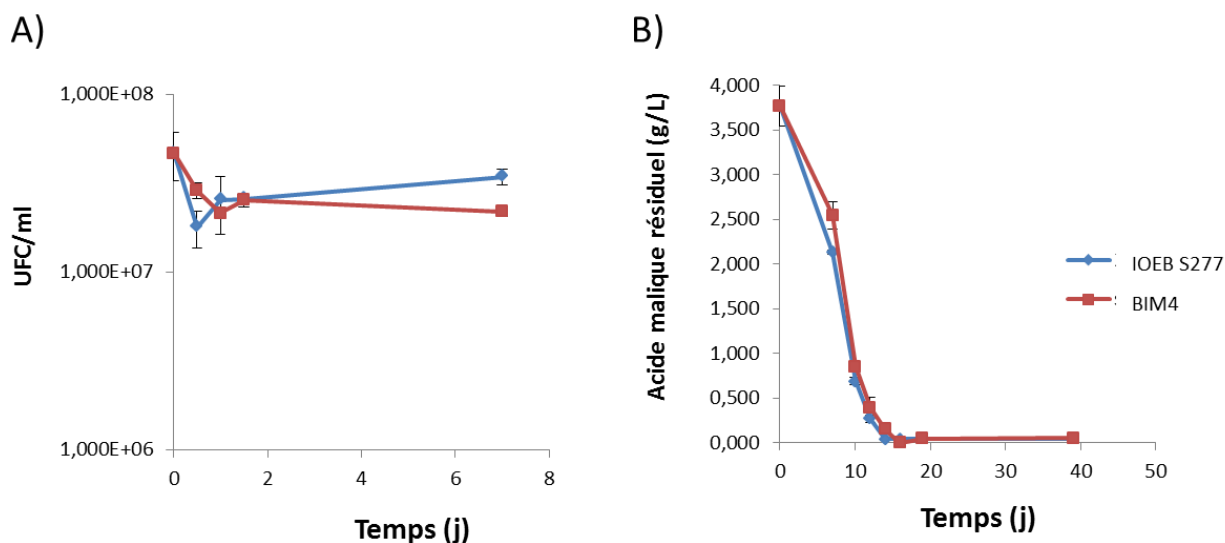
**A)** Les BIMs 1, 2, 3 et 4 sont présentées pistes 1, 2, 3 et 4. La souche parentale est piste 5; **B)** Les BIM4 DC 1, 2, 3 et 4 sont présentées pistes 1, 2, 3 et 4. La souche parentale est piste 5. L'enzyme *NotI* a été utilisée. Le marqueur de poids moléculaire est indiqué par \*

- la numération de la culture témoin ne montre jamais la présence de colonies rouges sur toute la période du suivi, et l'apparition des colonies rouges est donc liée à la présence des phages dans la culture ;
- l'effet n'est pas spécifique du phage car la même différenciation blanc/rouge des colonies se produit lors d'une infection de la souche avec le phage  $\phi 0608MC$  ;
- le ré-isolément des colonies sur gélose MRS conduit à la perte du phénotype « colonie rouge » ;
- enfin l'analyse de plusieurs colonies rouges et blanches montre que toutes sont résistantes au phage utilisé dans le challenge.

#### **4.2. Analyse de la résistance aux phages des BIMs de la souche sensible IOEB S277**

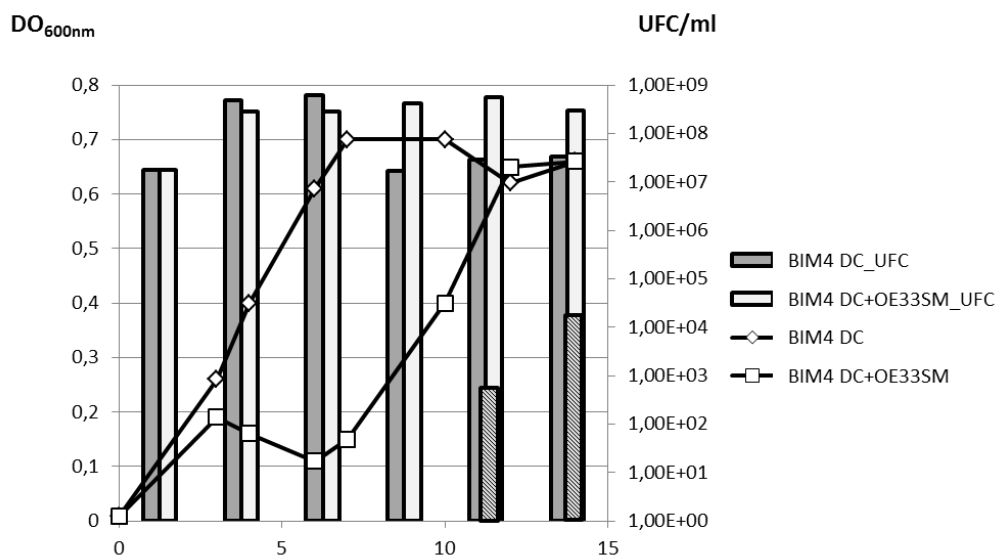
Plusieurs colonies blanches et rouges (10 de chaque type) obtenues lors des derniers prélèvements (J+14) ont été prélevées aléatoirement sur une boîte de numération, contenant respectivement 52 colonies blanches et 26 colonies rouges. Elles ont été mises en culture liquide dans du MRS. L'ADN de chaque culture est extrait sur carte FTA et utilisé comme matrice en PCR pour confirmer leur statut non lysogène. Tous les clones isolés sont non-lysogènes, et présentent une résistance au phage  $\phi 19-277$ .

Quatre clones (deux colonies rouges et deux colonies blanches) ont subi trois isoléments successifs sur gélose MRS. Le spectre de résistance des quatre clones BIMs isolés vis-à-vis des phages a été ensuite évalué (**Tab. XXIII**). Les quatre clones BIMs résistent à l'infection par  $\phi 19-277$ , et ceci malgré les repiquages effectués. La modification est stable. L'analyse des ADNs génomiques par une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ne montre aucune modification des profils par rapport à la souche de départ IOEB S277 (**Fig. 66**). La résistance n'est donc pas associée à des remaniements chromosomiques.



**Figure 67. Evaluations des capacités de FML de la souche *O. oeni* IOEB S277 (◆) et sur son dérivé BIM4 (■).**

**A)** Cinétique d'évolution des populations bactériennes (UFC/mL); **B)** évolution des teneurs en acide malique au cours du temps.



**Figure 68. Evolution des populations bactériennes et virales lors de l'infection prolongée de la souche IOEB S277-BIM4 DC par le phage OE33SM.**

Les courbes montrent l'évolution de l'absorbance en absence (◇) et en présence (□) du phage. Les numérations (UFC/mL) des échantillons témoins et infectés sont représentées par des histogrammes de couleur gris foncé, et gris clair, respectivement. La proportion de colonies rouges est représentée par un histogramme hachuré.

Le profil de résistance des BIMs a été testé vis-à-vis de dix autres phages, capables d'infecter la souche IOEB S277. La résistance observée chez les BIMs est élargie à neuf autres phages. Ainsi, la résistance apparue chez les BIMs est élevée ( $EOP < 10^{-5}$ ) vis-à-vis de huit phages (trois de type A, deux de type B et trois de type D). La résistance est moins forte vis-à-vis du phage OE33XP isolé de vin en échec de FML ( $EOP \sim 10^{-4}$ ). Les capacités d'adsorption du phage  $\phi 19-277$  sur la souche BIM4 ont été mesurées. Elles montrent que le titre en phages dans le surnageant ne varie pas au contact du BIM4 (résultats non montrés). La résistance développée par les BIMs, du moins par le clone BIM4, affecte la capacité du phage à s'adsorber sur la paroi de la cellule. Il s'agit probablement d'une mutation sur le gène codant le récepteur du phage.

De façon intéressante, le phage de type D OE33SM se développe sur les quatre BIMs, et ceci aussi efficacement que sur la souche sauvage IOEB S277 (**Tab. XXIII**). Le fait que le phage OE33SM est capable de lyser les différents BIMs indique qu'il peut s'adsorber sur la paroi. Si l'hypothèse d'une mutation des récepteurs du phage  $\phi 19-277$  se confirme chez le clone BIM4, alors OE33SM utilise un récepteur distinct. La diversité des récepteurs utilisés par les oenophages serait donc un mécanisme de résistance utilisé par *O. oeni*, comme proposé chez d'autres espèces bactériennes (Shin *et al.*, 2012; Ainsworth *et al.*, 2014).

La souche IOEB S277 est une souche commerciale. Nous avons donc évalué si le dérivé BIM4 conservait ses propriétés technologiques particulières et son aptitude à réaliser la FML. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 67**. La croissance de la souche BIM4 est légèrement ralentie par rapport à celle de la souche sauvage (**Fig. 67 A**). Ce retard est également visible lorsque la quantité d'acide malique est mesurée (**Fig. 67 B**). A J+7, la souche sauvage a dégradé environ 0,5 g/l d'acide malique supplémentaire par rapport à la souche BIM4. Toutefois, ce ralentissement est rattrapé, et la FML est complètement achevée dans les deux essais après 16 jours.

Un nouveau challenge de la souche BIM4 en présence du phage OE33SM (vis-à-vis duquel le clone est toujours sensible) a été réalisé (**Fig. 68**). Lors des premiers jours, le phage OE33SM inhibe la croissance du BIM4. Comme observé lors du premier challenge (avec le phage  $\phi 19-277$ ), une reprise de croissance est observée à partir du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation. Le phénomène d'apparition de colonies rouges est de nouveau visible sans qu'il y ait une





corrélation entre le pourcentage et le temps de prélèvement. L'analyse par PCR de 10 colonies rouges et de 10 autres blanches sur une boîte contenant 56 colonies (40 blanches et 16 rouges) n'a détecté aucun lysogène parmi les clones choisis. Enfin, le test de spectre de résistance de quatre clones (deux rouges et deux blanches) à l'ensemble des onze phages a été évalué. Les résultats (non montrés) révèlent que le clone BIM4 DC1 (pour BIM double challenge) a bien acquis la résistance au phage OE33SM avec un EOP  $< 10^{-6}$ , et qu'il a conservé le même niveau de résistance vis-à-vis du phage  $\phi$ 19-277 et des huit autres phages testés précédemment. Le phage OE33XP, dont le développement était partiellement bloqué par la souche BIM4, ne peut plus se multiplier sur le nouveau clone BIM4 DC1. Aucun réarrangement chromosomique n'est visible chez ce clone, ni chez trois autres clones testés en parallèle (**Fig. 66**). Toutefois, la stabilité du clone au cours de repiquages successifs et la possibilité de réversion (fréquentes chez certaines espèces pour les BIMs) restent à évaluer.

### 4.3. Le phénotype « colonies rouges »

Le phénotype est intrigant. Notre hypothèse quant à son apparition ferait appel à des capacités différentes des BIMs à fixer des molécules polyphénoliques du jus de raisin présent dans les géloses. Pour tester cette hypothèse, un ensemble de 40 colonies de chaque type (blanc/rouge) a été collecté à partir d'une même boîte. Chaque lot a été traité par différents solvants (extraction MeOH/ acide formique 1 %) et les extraits obtenus ont été analysés en collaboration avec le GESVAB. Dans deux essais indépendants, la présence de quercétin-glucuronide a été identifiée dans le lot de colonies rouges, alors que le composé était absent dans les colonies blanches prélevées dans les mêmes conditions. Ces études suggèrent la fixation de quercétine sur l'enveloppe cellulaire en présence de phages. Selon Koren *et al.* (2009), différents polyphénols sont à même de se lier de manière irréversible à la membrane de bactéries à Gram<sup>+</sup>, modifiant leur capacité anti-oxydante totale. La fixation de quercétine n'explique pas à elle seule l'aspect rouge des colonies, et il est probable que d'autres composés du jus de raisin sont également liés aux cellules.

Il est possible que l'infection par le phage résulte d'une libération de protéines virales dans le surnageant de la culture infectée. L'hypothèse serait que lorsque l'un de ces



composés dépasse une certaine concentration, il modifie les capacités de la cellule à fixer des composés polyphénoliques.



## **CONCLUSION GENERALE**



L'objectif premier de ce travail de thèse était de **renseigner sur la population phagique** capable d'infecter *O. oeni*, et **d'évaluer sa diversité**. Les données génomiques de plusieurs souches de *O. oeni* ont été exploitées. L'inventaire des prophages a permis de confirmer la forte fréquence de lysogénie dans l'espèce. En parallèle, nous avons isolé de nombreux phages à partir d'échantillons de vins à différents stades de la vinification. La fréquence élevée des phages dans l'environnement constitue probablement un biais lors de l'isolement de bactéries lactiques de l'environnement œnologique, surtout dès lors qu'un enrichissement en MRS est réalisé. Elle peut également expliquer en partie la difficulté à isoler des souches à partir de certains compartiments de l'écosystème, comme la surface des baies de raisin.

Une première **caractérisation des phages** a été initiée afin de disposer d'une classification. Chez les phages de BL, la classification repose sur les observations des particules en microscopie électronique, les hybridations ADN/ADN ou à présent le séquençage du génome. Seuls deux oenophages ont été observés en microscopie au cours de la thèse ( $\phi$ 19-277 et  $\phi$ 0608MC) et ils appartiennent à la famille des *Siphoviridae*. Ce travail devra être complété à l'avenir, car des différences pourraient exister entre les particules, et permettre un classement plus fin. Ainsi les phages de *Leuconostoc* isolés de produits laitiers appartiennent tous à la famille des *Siphoviridae*. Cependant, il existe des modifications mineures au niveau des appendices de la plaque basale, et cinq sous-groupes ont été définis (Kot *et al.*, 2014). Cette diversité morphologique est d'ailleurs surprenante, car le nombre de souches de *Leuconostoc* spp. utilisées en industrie laitière est faible. Dans notre étude, l'analyse des génomes des oenophages a été privilégiée. Leur taille correspond à la « zone basse » trouvée chez les *Siphoviridae* (22-56 kb), et est légèrement plus importante que celle associée aux phages de *Leuconostoc* (25-29 kb) (Kot *et al.*, 2014). L'organisation des modules, et le sens d'orientation des gènes sont deux éléments conservés chez tous les oenophages. De nouveau, la situation est différente chez un ensemble de 11 phages de *Leuconostoc* isolés à partir de matrices laitières et végétales (Kot *et al.*, 2014). Les génomes d'oenophages ne contiennent pas de *tRNA*. Ce caractère est souvent associé aux génomes de taille élevée, mais cependant des *tRNA* ont été récemment identifiés chez un phage de *Lb. plantarum* possédant un génome de taille moyenne (Briggiler Marco *et al.*, 2012).





Les oenophages isolés possèdent tous des séquences codant une intégrase. Des phages virulents existent, et nous en avons caractérisé un,  $\phi$ 19-277. Son génome contient une séquence *int*, ce qui suggère que les souches lysogènes sont le réservoir de ces phages virulents. L'analyse du module d'intégration (*int*/séquences d'attachement) permet de proposer un modèle d'intégration des prophages en quatre sites distincts du génome. La localisation du site d'intégration est liée à la possession d'un type d'intégrase particulier. Sur la base de ces travaux, une première classification en quatre groupes a été proposée et un ensemble de quatre réactions PCR a été mis au point. Il permet la détection et le typage rapide des oenophages présents dans l'environnement œnologique. Les prophages A, B et D sont actifs. Le groupe C est rare dans les génomes ainsi que dans l'environnement, et ceci serait lié au fait qu'ils sont défectifs. La contribution d'autres phages, ou d'ilôts, à la formation de particules de type C est suggérée.

L'analyse et la comparaison de la totalité des génomes prophagiques montrent très peu de conservation nucléotidique. Seule une portion interne du gène codant l'endolysine a été identifiée. L'approche de comparaison génomique montre que le groupe D est à part, tandis que les trois autres groupes ont probablement échangé des séquences. Une analyse *via* Virfam a été réalisée. L'analyse des *Siphoviridae* intègre l'organisation des gènes ainsi que les homologies présentées par les protéines MCP (Major Capsid Protein), portale, terminase (TermL), adaptatrice (Ad), Hc (Head-closure), Tc (Tail completion) et Major Tail Protein (MTP) avec les protéines phagiques disponibles dans les banques de données. Virfam place les oenophages de type D dans le cluster 1, ou groupe SPP1 (nommé aussi genre Sfi11 par Brüßow et Desiere en 2001). Ce groupe contient de nombreux phages de BL et autres bactéries à Gram<sup>+</sup>. Par contre, les oenophages de type A, B et C sont placés dans le cluster 2, qui contient également des phages de BL. L'ensemble des travaux ultérieurs ont montré que les phages D ont des spécificités, de par leur module de RSS, leur mode d'encapsidation, et également la stabilité de leur lysogénie.

Chez les autres modèles de BL, la population phagique capable de lyser les bactéries d'une espèce donnée est également très diverse. Il existe 10 espèces de phages infectant *Lc. lactis* et on note la nette dominance de l'espèce 936-like qui représente 70% des génomes disponibles (n = 70). Chez *S. thermophilus*, les phages associés aux fermentations du lait se répartissent en deux groupes majeurs, séparés selon la présence de mécanismes



d'encapsulation *cos* ou *pac* (Le Marrec *et al.*, 1997). Un troisième groupe génétique (5093-like) a récemment rapporté (Mills *et al.*, 2011), et ressemble plus aux phages de streptocoques non laitiers.

Le second objectif était de **mieux comprendre les interactions entre *O. oeni* et ses bactériophages**. Cet aspect est complexe, car il exige de prendre en compte trois composantes : le pouvoir infectieux des particules phagiques, l'état physiologique de l'hôte et enfin l'environnement fluctuant. Le milieu environnant peut inactiver les particules, empêchant l'infection. Les facteurs modulant la persistance des particules doivent donc être pris en compte. Le milieu peut également modifier la cellule bactérienne (métabolisme, propriétés de surface ...) et moduler sa capacité à être infectée. Nous avons étudié la persistance des oenophages et montré que la diversité génétique des phages est source de diversité phénotypique. La température, l'acide, et peut-être d'autres composés des vins blancs/rouges altèrent les particules. Leur persistance dans l'écosystème est donc variable. Il est souvent observé chez les phages que les vitesses de réplication élevées sont corrélées à une stabilité et une qualité moindres des particules (Keen, 2014).

La multiplication des phages sur leur hôte en milieu en jus de raisin a été démontrée. Les phages dans leur mode lytique peuvent donc modifier la population en tout début de vinification. L'attaque peut être rapide, et nous avons montré que le phage  $\phi$ 19-277 détruit son hôte en dix heures. La multiplication des phages tempérés sur leur hôte est modulée par la température, qui agit sur la décision lyse/lysogénie. La présence de polyphénols pourrait également interférer. La bactérie *O. oeni* exposée aux polyphénols pourrait par exemple réduire l'adsorption du phage, et avoir ainsi une meilleure chance de survie.

La multiplication des phages dans le vin (post FA) n'a pas été démontrée. A ce stade de la vinification, la relation phage-hôte serait différente car basée sur la lysogénie. Les prophages possèdent différents gènes conférant une adaptation supérieure des souches lysogènes vis-à-vis des contraintes. Ainsi, les prophages possèdent des répresseurs qui peuvent bloquer l'infection par des phages homologues (immunité à la surinfection). Par ailleurs, nous avons montré que les génomes des prophages contiennent sur leur extrémité un module distal. Ce module est associé à différents mécanismes de résistance aux phages



(Abi-Sie-RM), ce qui pourrait compenser l'absence de loci CRISPR chez *O. oeni*. Le module distal code également un transporteur impliqué dans l'efflux de sulfites, ou encore des gènes codant des glycosyltransférases. Dans ce dernier cas, Gtf peut favoriser (i) l'adhésion et la persistance des bactéries en biofilms, (ii) la tolérance aux stress, et/ou (iii) la résistance aux phages *via* une modification de l'enveloppe. L'étude des gènes *gtf* doit donc être développée. De même, des expériences de mesure de l'expression des gènes présents sur les modules distaux seront prochainement réalisées. Enfin, les mécanismes de recombinaison à l'origine de l'accrétion des gènes à cet endroit particulier du génome des prophages restent à caractériser. Il sera intéressant d'identifier les recombinases impliquées, leur nature et leur origine.

Les prophages pourraient ne pas être les seuls éléments génétiques mobiles à améliorer l'adaptation de *O. oeni* à son environnement. En effet, nous avons observé la présence d'ilôts mobiles, également intégrés en des sites tRNA. Ils contiennent un répertoire complexe et original de gènes. Certains ilôts sont rares et associés à des souches du cidre. Le génome accessoire aiderait donc l'adaptation à une niche donnée. L'exemple de l'ilôt I<sub>2</sub> suggère l'implication d'un gène codant une enzyme de restriction de type I dans la résistance de la souche IOEB 0608 vis-à-vis du phage  $\phi$ 19-277. Les ilôts pourraient par ailleurs réguler l'intégration/excision des autres prophages, ou bien l'expression de gènes bactériens. L'analyse de ces ilôts pose des questions sur leur origine (autres BL du moût ?), et la raison pour laquelle leur génome a été progressivement délété chez *O. oeni* contrairement aux phages de type A, B, C et D.

L'examen de plusieurs levains FML a montré que les industriels ont parfois sélectionné des souches lysogènes. Si la protection vis-à-vis des phages est plus élevée chez ces souches (*via* l'immunité à la surinfection et l'action des mécanismes de résistance présents sur les morons), la stabilité de la lysogénie semble être l'élément capital lors de l'inoculation des levains dans le vin. Nous avons montré qu'elle était liée au phage, et que les phages D étaient plus stables.



**La poursuite des travaux sur les oenophages nécessite d'améliorer les outils.** Nos travaux soulignent les difficultés liées aux matrices lors de l'isolement de phages. Il est possible que les particules établissent des liaisons (réversibles ou irréversibles) avec des composants endogènes. L'application d'étapes de filtration ou de centrifugation est susceptible de produire un biais dans les analyses. Le travail a fait largement appel à la technique de la double couche. Son utilisation dans le vin montre qu'elle donne une estimation minorée de la quantité de phages, car elle ne met en évidence que les particules infectieuses. La population de particules inactivées par le milieu n'est donc pas visible. Nous avons montré l'existence de cette population par une approche de qPCR, appliquée après précipitation des particules du vin. L'utilisation combinée des deux techniques sera un apport pour de futures études. Une transition vers une approche qPCR-EMA mise en place pour les phages T4 (Fittipaldi *et al.*, 2010) peut également être envisagée.

Enfin, pour conclure, nos travaux ont abordé **la co-évolution phages-bactéries** dans l'environnement, *via* l'isolement de BIMs. L'expérience a consisté à soumettre une culture à une forte pression en phage (MOI de 0.01). Après un seul challenge, nous avons observé l'apparition de clones résistants après quelques jours de contact. Le phénotype hypermutateur favorise donc rapidement l'émergence de mutants. Des expériences sont à reproduire afin de tester différentes MOI initiales, afin de savoir dans quels rapports de population ces BIMs sont susceptibles d'émerger, et si la situation se produit naturellement lors de vinifications spontanées. Si cela est le cas, la population aurait une dynamique particulière, constituée de vagues successives d'infection, puis d'émergence de BIMs.

La caractérisation des BIMs a apporté une information intéressante quant aux récepteurs utilisés. Il existerait au moins deux récepteurs chez *O. oeni* qui sont reconnus par les anti-récepteurs phagiques. Il est à noter que l'anti-récepteur du phage 1-A4 de *Leuconostoc mesenteroides* montre une certaine similarité (*via* une analyse PSI-BLAST) avec l'anti-récepteur du phage fOg44 (Lu *et al.*, 2010). Les connaissances des couples récepteurs-antirécepteurs ont progressé au cours des dernières années chez les BL et il est établi que de nombreux phages reconnaissent des motifs saccharidiques, ou des protéines à la surface de l'hôte. Le rôle des cations est également mieux compris. Ainsi, en présence de calcium, il a





été montré que la plaque basale des phages de lactocoques de type 936-like subit un mouvement de 200° lui permettant de se réaligner en face de l'hôte. Cette activation par le calcium expliquerait la dominance de cette espèce de phages dans le lait (Sciara *et al.*, 2010).

Selon Filée *et al.* (2005), les phages sont la matière noire (« dark matter ») de la biosphère, et les connaissances que nous avons aujourd'hui de leur écologie et de leur diversité correspondent à la partie émergée de l'iceberg. C'est probablement le cas particulier des oenophages lors des fermentations du vin. Il en est de même quant à leur place particulière dans l'évolution de *O. oeni*.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



**A**

- Abedon ST** (2011) Lysis from without. *Bacteriophage* **1**:46–49.
- Ackermann H-W** (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* **152**:227–243.
- Ackermann HW** (2011) Bacteriophage taxonomy. *Microbiol Aust* **32**:90–94.
- Ackermann HW, and Eisenstark A** (1974) The present state of phage taxonomy. *Intervirology* **3**:201–219.
- Ackermann H-W, and Prangishvili D** (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol* **157**:1843–1849.
- Adams MH, and Anderson ES** (1960) *Bacteriophages*, Wiley, New York, N.Y.
- Ahmad A, Farhan Asad S, Singh S, and Hadi SM** (2000) DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett* **154**:29–37.
- Ainsworth S, Sadovskaya I, Vinogradov E, Courtin P, Guerardel Y, Mahony J, Grard T, Cambillau C, Chapot-Chartier M-P, and van Sinderen D** (2014) Differences in Lactococcal Cell Wall Polysaccharide Structure Are Major Determining Factors in Bacteriophage Sensitivity. *mBio* **5**.
- Alexander Sulakvelidze, and Paul Barrow** (2004) Phage Therapy in Animals and Agribusiness, in *Bacteriophages*, CRC Press.
- Ali Y, Koberg S, Hessner S, Sun X, Rabe B, Back A, Neve H, and Heller KJ** (2014) Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. *Front Microbiol* **5**.
- Anderson B, Rashid MH, Carter C, Pasternack G, Rajanna C, Revazishvili T, Dean T, Senecal A, and Sulakvelidze A** (2011) Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR- and NanoSight-based assays. *Bacteriophage* **1**:86–93.
- Arber W** (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* 9. Host-controlled modification of bacteriophage fd. *J Mol Biol* **20**:483–496.
- Arendt EK, and Hammes WP** (1992) Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* phages from German wines. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**:643–646.
- Arendt EK, Lonvaud A, and Hammes WP** (1991) Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. *J Gen Microbiol* **137**:2135–2139.
- Arendt EK, Neve H, and Hammes WP** (1990) Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**:220–224.
- Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, and Hayashi T** (2009) The Defective Prophage Pool of *Escherichia coli* O157: Prophage–Prophage Interactions Potentiate Horizontal Transfer of Virulence Determinants. *PLoS Pathog* **5**:e1000408.
- Assad-García J s., Bonnin-Jusserand M, Garmyn D, Guzzo J, Alexandre H, and Grandvalet C** (2008) An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Lett Appl Microbiol* **47**:333–338.
- Athané A, Bilhère E, Bon E, Morel G, Lucas P, Lonvaud A, and Le Marrec C** (2008) Characterization of an acquired *dps*-containing gene island in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **105**:1866–1875.



Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, and Zagnitko O (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**:75.

## **B**

Badotti F, Moreira APB, Tonon LAC, Lucena BTL de, Gomes F de CO, Kruger R, Thompson CC, Jr MA de M, Rosa CA, and Thompson FL (2014) *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1–9.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, and Horvath P (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**:1709–1712.

Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, and Rohwer F (2013) Bacteriophage adhering to mucus provide a non–host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci* 201305923.

Barr JJ, Dutilh B, Auro R, Nguyen S, Benler S, Smilowitz J, German B, and Rohwer F (2014, July) Bacteriophage in human breast milk provide infant mucosal immunity. Communication orale présentée dans le cadre du congrès *Viruses of Microbes*, Zurich, Suisse.

Bartowsky EJ (2005) *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust J Grape Wine Res* **11**:174–187.

Bartowsky EJ, and Borneman AR (2011) Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**:441–447.

Beelman RB, McArdle FJ, and Duke GR (1980) Comparison of *Leuconostoc oenos* Strains ML-34 and PSU-1 to Induce Malo-Lactic Fermentation in Pennsylvania Red Table Wines. *Am J Enol Vitic* **31**:269–276.

Belcaid M, Bergeron A, and Poisson G (2011) The evolution of the tape measure protein: units, duplications and losses. *BMC Bioinformatics* **12**:S10.

Belle A, Landthaler M, and Shub DA (2002) Intronless homing: site-specific endonuclease SegF of bacteriophage T4 mediates localized marker exclusion analogous to homing endonucleases of group I introns. *Genes Dev* **16**:351–362.

Bilhere E, Lucas PM, Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2008) Multilocus Sequence Typing of *Oenococcus oeni*: Detection of Two Subpopulations Shaped by Intergenic Recombination. *Appl Environ Microbiol* **75**:1291–1300.

Binetti AG, Quiberoni A, and Reinheimer JA (2002) Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Res Int* **35**:73–83.

Bjarnsholt T (2013) The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* **121**:1–58.

Bobay L-M, Rocha EPC, and Touchon M (2013) The Adaptation of Temperate Bacteriophages to Their Host Genomes. *Mol Biol Evol* **30**:737–751.

Bobay L-M, Touchon M, and Rocha EPC (2014) Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:12127–12132.

Boizet B, Mata M, Mignot O, Ritzenthaler P, and Sozzi T (1992) Taxonomic characterization of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc oenos* bacteriophage. *FEMS Microbiol Lett* **90**:211–215.





- Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, and Mills DA** (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci* **111**:E139–E148.
- Bon E, Delaherche A, Bilhere E, De Daruvar A, Lonvaud-Funel A, and Le Marrec C** (2009) *Oenococcus oeni* Genome Plasticity Is Associated with Fitness. *Appl Environ Microbiol* **75**:2079–2090.
- Bonocora RP, Zeng Q, Abel EV, and Shub DA** (2011) A homing endonuclease and the 50-nt ribosomal bypass sequence of phage T4 constitute a mobile DNA cassette. *Proc Natl Acad Sci* **108**:16351–16356.
- Borneman AR, Bartowsky EJ, McCarthy J, and Chambers PJ** (2010) Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:681–691.
- Borneman AR, McCarthy JM, Chambers PJ, and Bartowsky EJ** (2012) Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics* **13**:373.
- Bossi L, Fuentes JA, Mora G, and Figueroa-Bossi N** (2003) Prophage Contribution to Bacterial Population Dynamics. *J Bacteriol* **185**:6467–6471.
- Botsaris G, Slana I, Liapi M, Dodd C, Economides C, Rees C, and Pavlik I** (2010) Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. *Int J Food Microbiol* **141**, Supplement:S87–S90.
- Botstein D** (1980) A Theory of Modular Evolution for Bacteriophages\*. *Ann N Y Acad Sci* **354**:484–491.
- Boyd EF** (2012) Bacteriophage-Encoded Bacterial Virulence Factors and Phage–Pathogenicity Island Interactions, in *Advances in Virus Research* pp 91–118, Elsevier.
- Bradley DE** (1967) Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev* **31**:230–314.
- Breitbart M, and Rohwer F** (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* **13**:278–284.
- Bridier J, Claisse O, Coton M, Coton E, and Lonvaud-Funel A** (2010) Evidence of Distinct Populations and Specific Subpopulations within the Species *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* **76**:7754–7764.
- Brige A, Van Den Hemel D, Carpentier W, De Smet L, and Van Beeumen JJ** (2006) Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function. *Biochem J* **394**:335–344.
- Briggiler Marco M, Garneau JE, Tremblay D, Quiberoni A, and Moineau S** (2012) Characterization of Two Virulent Phages of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **78**:8719–8734.
- Brodie R, Roper RL, and Upton C** (2004) JDotter: a Java interface to multiple dotplots generated by dotter. *Bioinformatics* **20**:279–281.
- Brüssow H** (2012) What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* **434**:138–142.
- Brüssow H, Canchaya C, and Hardt W-D** (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:560–602.
- Bruttin A, and Brüssow H** (1996) Site-specific spontaneous deletions in three genome regions of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage. *Virology* **219**:96–104.
- Brüssow H, and Desiere F** (2001) Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol Microbiol* **39**:213–223.



**Bruttin A, Desiere F, Lucchini S, Foley S, and Brüssow H** (1997) Characterization of the lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage phi Sfi21. *Virology* **233**:136–148.

**Bruttin A, Foley S, and Brüssow H** (2002) DNA-Binding Activity of the *Streptococcus thermophilus* Phage Sfi21 Repressor. *Virology* **303**:100–109.

**Buzrul S, Öztürk P, Alpas H, and Akcelik M** (2007) Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT - Food Sci Technol* **40**:1671–1677.

## C

**Campbell AM** (2002) Preferential Orientation of Natural Lambdoid Prophages and Bacterial Chromosome Organization. *Theor Popul Biol* **61**:503–507.

**Campbell-Sills H, El Khoury M, Favier M, Romano A, Biasioli F, Spano G, Sherman D, Bouchez O, Coton E, Coton M, Okada S, Tanaka N, Dols-Lafargue D, Lucas P.** Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals the species population structure and domestication of wine-adapted strains. *Genome Biol. Evol.* (Article soumis)

**Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann M-L, and Brüssow H** (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**:417–424.

**Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, and Brüssow H** (2003) Prophage Genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:238–276.

**Capozzi V, Russo P, Beneduce L, Weidmann S, Grieco F, Guzzo J, and Spano G** (2010) Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett Appl Microbiol* **50**:327–334.

**Capra ML, Mercanti DJ, Reinheimer JA, and Quiberoni AL** (2010) Characterisation of three temperate phages released from the same *Lactobacillus paracasei* commercial strain. *Int J Dairy Technol* **63**:396–405.

**Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J, and Ramirez M** (2010) Prophage Spontaneous Activation Promotes DNA Release Enhancing Biofilm Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* **5**:e15678.

**Casjens S** (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* **49**:277–300.

**Casjens SR, and Gilcrease EB** (2009) Determining DNA Packaging Strategy by Analysis of the Termini of the Chromosomes in Tailed-Bacteriophage Virions. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **502**:91–111.

**Castro-Nallar E, Chen H, Gladman S, Moore SC, Seemann T, Powell IB, Hillier A, Crandall KA, and Chandry PS** (2012) Population genomics and phylogeography of an Australian dairy factory derived lytic bacteriophage. *Genome Biol Evol* **4**:382–393.

**Cazelles O, and Gnaegi F** (1982) *Enquête sur l'importance pratique du problème des bactériophages dans le vin*, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, [Nyon].

**Celik H, and Arinç E** (2010) Evaluation of the protective effects of quercetin, rutin, naringenin, resveratrol and trolox against idarubicin-induced DNA damage. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm* **13**:231–241.

**Chapot-Chartier M-P** (2014) Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Front Microbiol* **5**.



- Chapot-Chartier M-P, Vinogradov E, Sadovskaya I, Andre G, Mistou M-Y, Trieu-Cuot P, Furlan S, Bidnenko E, Courtin P, Pechoux C, Hols P, Dufrene YF, and Kulakauskas S** (2010) Cell Surface of *Lactococcus lactis* Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle. *J Biol Chem* **285**:10464–10471.
- Chen Y, Golding I, Sawai S, Guo L, and Cox EC** (2005) Population Fitness and the Regulation of *Escherichia coli* Genes by Bacterial Viruses. *PLoS Biol* **3**:e229.
- Chopin M-C, Chopin A, and Bidnenko E** (2005) Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol* **8**:473–479.
- Claisse O, and Lonvaud-Funel A** (2012) Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* **30**:340–347.
- Claisse O, and Lonvaud-Funel A** (2013) Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiol*, doi: 10.1016/j.fm.2013.08.012.
- Clark AJ, Inwood W, Cloutier T, and Dhillon TS** (2001) Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *J Mol Biol* **311**:657–679.
- Coburn B, Sekirov I, and Finlay BB** (2007) Type III Secretion Systems and Disease. *Clin Microbiol Rev* **20**:535–549.
- Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, and Coton E** (2010) Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol* **27**:1078–1085.
- Coucheney F, Desroche N, Bou M, Tourdot-Maréchal R, Dulau L, and Guzzo J** (2005) A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol* **105**:463–470.
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, and Henrissat B** (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**:307–317.
- Cumby N, Davidson AR, and Maxwell KL** (2012) The moron comes of age. *Bacteriophage* **2**:225–228.
- Cumby N, Edwards AM, Davidson AR, and Maxwell KL** (2012) The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *J Bacteriol* **194**:5012–5019.

## D

- Dallennes J**, (2007) *Génomique des phages infectant la bactérie lactique Oenococcus oeni*. Projet de recherche Master 2<sup>ème</sup> année, Université Victor Segalen Bordeaux.
- Dalmasso M, Hill C, and Ross RP** (2014) Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol* **22**:399–405.
- Davidson AL, and Chen J** (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**:241–268.
- Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, and Lee TH** (1988) Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am J Enol Vitic* **39**:137–142.
- Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH, and Fleet GH** (1986) Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Appl Environ Microbiol* **51**:539–545.
- Davis C, Silveira NF, and Fleet GH** (1985) Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol* **50**:872–876.



- Dean P** (2011) Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol Rev* **35**:1100–1125.
- Debret G** (2007) Etude par modélisation moléculaire des propriétés mécaniques d'un système membranaire : le canal mécanosensible Mscl au sein de bicouches lipidiques modèles, Université Paris-Diderot - Paris VII.
- Delaherche A, Bon E, Dupé A, Lucas M, Arveiler B, Daruvar A, and Lonvaud-Funel A** (2006) Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**:394–403.
- De MAN JC, Rogosa M, and Sharpe ME** (1960) A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **23**:130–135.
- Denes T, Vongkamjan K, Ackermann H-W, Moreno Switt AI, Wiedmann M, and den Bakker HC** (2014) Comparative genomic and morphological analyses of *Listeria* phages isolated from farm environments. *Appl Environ Microbiol* **80**:4616–4625.
- De Paepe M, Hutinet G, Son O, Amarir-Bouhram J, Schbath S, and Petit M-A** (2014) Temperate Phages Acquire DNA from Defective Prophages by Relaxed Homologous Recombination: The Role of Rad52-Like Recombinases. *PLoS Genet* **10**:e1004181.
- De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, and Petit M-A** (2014) Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* **4**.
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, and Moineau S** (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**:1390–1400.
- D' Herelle F** (1931) Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull N Y Acad Med* **7**:329–348.
- D'Herelle F** (2007) On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol* **158**:553–554.
- Dicks LM, Dellaglio F, and Collins MD** (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**:395–397.
- Dicks LMT, Vuuren HJJV, and Dellaglio F** (1990) Taxonomy of *Leuconostoc* Species, Particularly *Leuconostoc oenos*, as Revealed by Numerical Analysis of Total Soluble Cell Protein Patterns, DNA Base Compositions, and DNA-DNA Hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **40**:83–91.
- Dieterle ME, Jacobs-Sera D, Russell D, Hatfull G, and Piuri M** (2014) Complete Genome Sequences of Lactobacillus Phages J-1 and PL-1. *Genome Announc* **2**.
- 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*, Bordeaux 2.
- Dimopoulou M, Vuillemin M, Campbell-Sills H, Lucas PM, 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, and Dols-Lafargue M** (2014) Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni*: From Genes to Phenotypes. *PLoS ONE* **9**.
- Dols-Lafargue M, Lee HY, Le Marrec C, Heyraud A, Chambat G, and 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. *Appl Environ Microbiol* **74**:4079–4090.





- Donnelly-Wu MK, Jacobs WR, and Hatfull GF** (1993) Superinfection immunity of mycobacteriophage L5: applications for genetic transformation of mycobacteria. *Mol Microbiol* **7**:407–417.
- Doria F, Napoli C, Costantini A, Berta G, Saiz J-C, and Emilia Garcia-Moruno** (2013) Development of a New Method for Detection and Identification of *Oenococcus oeni* Bacteriophages Based on Endolysin Gene Sequence and Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Appl Environ Microbiol* **79**:4799–4805.
- Dublanchet A** (2008) La phagothérapie au XXIe siècle. Deuxième partie : expérience actuelle. *Antibiotiques* **10**:219–225.
- Dubrovic EV, Popova AV, Kraevskiy SV, Ignatov SG, Ignatyuk TE, Yaminsky IV, and Volozhantsev NV** (2012) Atomic Force Microscopy Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage AP22 Lytic Cycle. *PLoS ONE* **7**:e47348.
- Duckworth DH** (1976) “Who discovered bacteriophage?”. *Bacteriol Rev* **40**:793–802.
- Duerkop BA, Clements CV, Rollins D, Rodrigues JLM, and Hooper LV** (2012) A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:17621–17626.
- Dupont K, Janzen T, Vogensen FK, Josephsen J, and Stuer-Lauridsen B** (2004) Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl Environ Microbiol* **70**:5825–5832.
- Dupuis M-E, and Moineau S** (2010) Genome Organization and Characterization of the Virulent Lactococcal Phage 1358 and Its Similarities to *Listeria* Phages. *Appl Environ Microbiol* **76**:1623–1632.
- Durmaz E, and Klaenhammer TR** (2007) Abortive Phage Resistance Mechanism AbiZ Speeds the Lysis Clock To Cause Premature Lysis of Phage-Infected *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **189**:1417–1425.
- Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GGZ, Boling L, Barr JJ, Speth DR, Seguritan V, Aziz RK, Felts B, Dinsdale EA, Mokili JL, and Edwards RA** (2014) A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun* **5**.

## E

- Edwards CG, Jensen KA, Spayd SE, and Seymour BJ** (1991) Isolation and Characterization of Native Strains of *Leuconostoc oenos* from Washington State Wines. *Am J Enol Vitic* **42**:219–226.
- Eklund MW, Poysky FT, and Reed SM** (1972) Bacteriophage and the Toxigenicity of *Clostridium botulinum* Type D. *Nature* **235**:16–17.
- Eklund MW, Poysky FT, Reed SM, and Smith CA** (1971) Bacteriophage and the Toxigenicity of *Clostridium botulinum* Type C. *Science* **172**:480–482.
- Elbreki M, Ross RP, Hill C, O’Mahony J, McAuliffe O, and Coffey A** (2014) Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *J Viruses* **2014**:e382539.
- El Gharniti F, Dols-Lafargue M, Bon E, Claisse O, Miot-Sertier C, Lonvaud A, and Le Marrec C** (2012) IS30 elements are mediators of genetic diversity in *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* **158**:14–22.
- El Khoury M,** (2014) *Etude de la diversité des souches de Oenococcus oeni responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles.* Thèse de l’Université de Bordeaux.
- Ellis EL, and Delbruck M** (1939) THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE. *J Gen Physiol* **22**:365–384.



**Endo A, and Okada S** (2006) *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2345–2348.

**Endo A, and Okada S** (2008) Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:2195–2205.

## E

**Favier M** (2012) *Etude des plasmides et génomes d'Oenococcus oeni pour l'identification des gènes d'intérêt technologique*, Bordeaux 2.

**Favier M, Bilhere E, Lonvaud-Funel A, Moine V, and Lucas PM** (2012) Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. *PLoS ONE* **7**.

**Figuroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, and Bossi L** (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**:260–272.

**Filée J, Tétart F, Suttle CA, and Krisch HM** (2005) Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:12471–12476.

**Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, Adrados B, Peñuela GA, and Morató J** (2010) Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods* **168**:228–232.

**Fogg PCM, Colloms S, Rosser S, Stark M, and Smith MCM** (2014) New Applications for Phage Integrases. *J Mol Biol* **426**:2703–2716.

**Folgering JHA, Moe PC, Schuurman-Wolters GK, Blount P, and Poolman B** (2005) *Lactococcus lactis* uses MscL as its principal mechanosensitive channel. *J Biol Chem* **280**:8784–8792.

**Forde A, Daly C, and Fitzgerald GF** (1999) Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Appl Environ Microbiol* **65**:1540–1547.

**Ford ME, Sarkis GJ, Belanger AE, Hendrix RW, and Hatfull GF** (1998) Genome structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *J Mol Biol* **279**:143–164.

**Fortier L-C, and Sekulovic O** (2013) Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* **4**:354–365.

**Foschino R, Perrone F, and Galli A** (1995) Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. *J Appl Bacteriol* **79**:677–683.

**Foschino R, Venturelli E, and Picozzi C** (2005) Isolation and characterization of a virulent *Lactobacillus sanfranciscensis* bacteriophage and its impact on microbial population in sourdough. *Curr Microbiol* **51**:413–418.

**Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, Pariente K, Segondy M, Burguière A, Manuguerra J-C, Caro V, and Eloit M** (2012) Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS ONE* **7**:e38499.

**Fouts DE** (2006) Phage\_Finder: Automated identification and classification of prophage regions in complete bacterial genome sequences. *Nucleic Acids Res* **34**:5839–5851.

**Frost LS, Leplae R, Summers AO, and Toussaint A** (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**:722–732.



**G**

- Gagné S, Lucas P M., Perello M c., Claisse O, Lonvaud-Funel A, and De Revel G** (2011) Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J Appl Microbiol* **110**:218–228.
- Galindo I, Hernández B, Berná J, Fenoll J, Cenis JL, Escribano JM, and Alonso C** (2011) Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. *Antiviral Res* **91**:57–63.
- Gama JA, Reis AM, Domingues I, Mendes-Soares H, Matos AM, and Dionisio F** (2013) Temperate Bacterial Viruses as Double-Edged Swords in Bacterial Warfare. *PLoS ONE* **8**.
- García-Pino A, Christensen-Dalsgaard M, Wyns L, Yarmolinsky M, Magnuson RD, Gerdes K, and Loris R** (2008) Doc of Prophage P1 Is Inhibited by Its Antitoxin Partner Phd through Fold Complementation. *J Biol Chem* **283**:30821–30827.
- García P, Martínez B, Obeso J m., and Rodríguez A** (2008) Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* **47**:479–485.
- García-Ruiz A, Moreno-Arribas MV, Martín-Álvarez PJ, and Bartolomé B** (2011) Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **145**:426–431.
- Garneau JE, and Moineau S** (2011) Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* **10**:S20.
- Garvie EI** (1967) *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J Gen Microbiol* **48**:431–438.
- Gauss P, Park K, Spencer TE, and Hacker KJ** (1994) DNA helicase requirements for DNA replication during bacteriophage T4 infection. *J Bacteriol* **176**:1667–1672.
- Gill JJ, Berry JD, Russell WK, Lessor L, Escobar-Garcia DA, Hernandez D, Kane A, Keene J, Maddox M, Martin R, Mohan S, Thorn AM, Russell DH, and Young R** (2012) The *Caulobacter crescentus* phage phiCbK: genomics of a canonical phage. *BMC Genomics* **13**:542.
- Gindreau E** (1998) *Etudes sur les bactériophages d’Oenococcus oeni (Leuconostoc oenos): Evaluation de leur incidence en vinification. Analyse moléculaire des systèmes d’intégration et de lyse du bactériophage tempéré phi10MC*, Bordeaux 2.
- Gindreau E, Joyeux A, De Revel G, Claisse O, and Lonvaud Funel A** (1997) Evaluation of the settling of malolactic starters within the indigenous microflora of wines. *J Int Sci Vigne Vin Fr.*
- Gindreau E, Torlois S, and Lonvaud-Funel A** (1997) Identification and sequence analysis of the region encoding the site-specific integration system from *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) temperate bacteriophage phi 10MC. *FEMS Microbiol Lett* **147**:279–285.
- Goeders N, and Van Melderen L** (2014) Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins* **6**:304–324.
- Górski A, Kniotek M, Perkowska-Ptasińska A, Mróz A, Przerwa A, Gorczyca W, Dąbrowska K, Weber-Dąbrowska B, and Nowaczyk M** (2006) Bacteriophages and Transplantation Tolerance. *Transplant Proc* **38**:331–333.
- Grath SM, and Sinderen D van** (2007) *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*, Horizon Scientific Press.



- Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM, Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, and Gelbart WM** (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th ed., W. H. Freeman.
- Guerois R, Delattre R, Souiai O, Lopes A, Tavares P, Zinn-Justin S and Petit M-A** (2014) Phagonaute and Virfam, two Web interfaces facilitating phage genome annotation. Poster présenté dans le cadre du congrès *Viruses of Microbes*, Zurich, Suisse.
- Guerrini S, Bastianini A, Blaiotta G, Granchi L, Moschetti G, Coppola S, Romano P, and Vincenzini M** (2003) Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol* **83**:1–14.
- Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, and Quiberoni ADL** (2012) Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Food Microbiol* **2**:282.
- Gutiérrez D, Martín-Platero AM, Rodríguez A, Martínez-Bueno M, García P, and Martínez B** (2011) Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiol Lett* **322**:90–97.
- Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin MP, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin JF, and Diviès C** (1997) A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett Appl Microbiol* **24**:393–396.

## H

- Haaber J, Moineau S, Fortier L-C, and Hammer K** (2008) AbiV, a Novel Antiphage Abortive Infection Mechanism on the Chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Appl Environ Microbiol* **74**:6528–6537.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, and Nelson KE** (2005) A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Comput Biol* **1**:e60.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, and Stoodley P** (2004) Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**:95–108.
- Hargreaves KR, Kropinski AM, and Clokie MR** (2014) Bacteriophage behavioral ecology: How phages alter their bacterial host's habits. *Bacteriophage* **4**:e29866.
- Hendrix RW** (2009) Jumbo bacteriophages, in *Lesser Known Large dsDNA Viruses* pp 229–240, Springer.
- Hendrix RW** (1983) *Lambda II*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Henick-Kling T, Lee TH, and Nicholas DJD** (1986) Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage. *J Appl Bacteriol* **61**:287–293.
- Herold S, Karch H, and Schmidt H** (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. *Int J Med Microbiol* **294**:115–121.
- Hershey AD, and Chase M** (1952) Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *J Gen Physiol* **36**:39–56.
- Hill C, Miller LA, and Klaenhammer TR** (1991) In vivo genetic exchange of a functional domain from a type II A methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *J Bacteriol* **173**:4363–4370.
- Hooton SPT, Atterbury RJ, and Connerton IF** (2011) Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella Typhimurium* U288 contamination on pig skin. *Int J Food Microbiol* **151**:157–163.





**Horvath P, Coûté-Monvoisin A-C, Romero DA, Boyaval P, Fremaux C, and Barrangou R** (2009) Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol* **131**:62–70.

**Huang C-M, Asmundson RV, and Kelly WJ** (1996) Characterization of a temperate phage isolated from *Leuconostoc oenos* strain 1002. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**:472–476.

### **I, J, K**

**Inoue H, Suzuki D, and Asai K** (2013) A putative bactoprenol glycosyltransferase, CsbB, in *Bacillus subtilis* activates SigM in the absence of co-transcribed YfhO. *Biochem Biophys Res Commun* **436**:6–11.

**Inoue Y, Matsuura T, Ohara T, and Azegami K** (2006) Bacteriophage OP1, lytic for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, changes its host range by duplication and deletion of the small domain in the deduced tail fiber gene. *J Gen Plant Pathol* **72**:111–118.

**Isidro A, Henriques AO, and Tavares P** (2004) The portal protein plays essential roles at different steps of the SPP1 DNA packaging process. *Virology* **322**:253–263.

**Izquierdo PM, García E, Martínez J, and Chacón JL** (2004) Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel. *VITIS-GEILWEILERHOF* **43**:149–154.

**Jonczyk E, Klak M, Miedzybrodzki R, and Gorski A** (2011) The influence of external factors on bacteriophages--review. *Folia Microbiol (Praha)* **56**:191–200.

**Juhala RJ, Ford ME, Duda RL, Youlton A, Hatfull GF, and Hendrix RW** (2000) Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. *J Mol Biol* **299**:27–51.

**Julio SM, Heithoff DM, and Mahan MJ** (2000) *ssrA* (tmRNA) plays a role in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* pathogenesis. *J Bacteriol* **182**:1558–1563.

**Kala S, Cumby N, Sadowski PD, Hyder BZ, Kanelis V, Davidson AR, and Maxwell KL** (2014) HNH proteins are a widespread component of phage DNA packaging machines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:6022–6027.

**Karzai AW, Roche ED, and Sauer RT** (2000) The SsrA–SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Mol Biol* **7**:449–455.

**Keen EC** (2014) Tradeoffs in bacteriophage life histories. *Bacteriophage* **4**.

**King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, and Lefkowitz EJ eds** (2012) Part I. Introduction, in *Virus Taxonomy* pp 1–20, Elsevier, San Diego.

**King SW, and Beelman RB** (1986) Metabolic Interactions Between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a Model Grape Juice/Wine System. *Am J Enol Vitic* **37**:53–60.

**Kleppen HP, Nes IF, and Holo H** (2012) Characterization of a *Leuconostoc* Bacteriophage Infecting Flavor Producers of Cheese Starter Cultures. *Appl Environ Microbiol* **78**:6769–6772.

**Kobayashi I** (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* **29**:3742–3756.

**Kong J, and Josephsen J** (2002) The ability of the plasmid-encoded restriction and modification system *LlaBIII* to protect *Lactococcus lactis* against bacteriophages. *Lett Appl Microbiol* **34**:249–253.

**Koren E, Kohen R, and Ginsburg I** (2009) A Cobalt-Based Tetrazolium Salts Reduction Test To Assay Polyphenols. *J Agric Food Chem* **57**:7644–7650.



**Kot W, Hansen LH, Neve H, Hammer K, Jacobsen S, Pedersen PD, Sørensen SJ, Heller KJ, and Vogensen FK** (2014) Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. *Int J Food Microbiol* **176**:29–37.

**Kutateladze M, and Adamia R** (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine Mal Infect* **38**:426–430.

**Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, and Abedon S** (2010) Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Curr Pharm Biotechnol* **11**:69–86.

## L

**Labrie SJ, Samson JE, and Moineau S** (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* **8**:317–327.

**Labrie S, and Moineau S** (2000) Multiplex PCR for detection and identification of lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **66**:987–994.

**Larisika M, Claus H, and König H** (2008) Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int J Food Microbiol* **123**:171–176.

**Lechiancole T, Blaiotta G, Messina D, Fusco V, Villani F, and Salzano G** (2006) Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst Appl Microbiol* **29**:375–381.

**Lee A, Eschenbruch R, and Waller J** (1985) Effect of phenolic compounds, ethyl alcohol, and sodium metabisulphite on the lytic activity of phage PL-1 on a *Lactobacillus casei* S strain. *Can J Microbiol* **31**:873–875.

**Lee SH, Jung JY, Lee SH, and Jeon CO** (2011) Complete Genome Sequence of *Leuconostoc kimchii* Strain C2, Isolated from Kimchi. *J Bacteriol* **193**:5548–5548.

**Le Jeune C, and Lonvaud-Funel A** (1997) Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc aenos* (*Oenococcus aeni*): application to strain differentiation. *Res Microbiol* **148**:79–86.

**Le Marrec C** (2011) Responses of Lactic Acid Bacteria to Osmotic Stress, in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (Tsakalidou E, and Papadimitriou K eds) pp 67–90, Springer US.

**Le Marrec C, Moreau S, Loury S, Blanco C, and Trautwetter A** (1996) Genetic characterization of site-specific integration functions of phi AAU2 infecting “*Arthrobacter aureus*” C70. *J Bacteriol* **178**:1996–2004.

**Le Marrec C, Sinderen D van, Walsh L, Stanley E, Vlegels E, Moineau S, Heinze P, Fitzgerald G, and Fayard B** (1997) Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol* **63**:3246–3253.

**Lepplae R, Hebrant A, Wodak SJ, and Toussaint A** (2004) ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements. *Nucleic Acids Res* **32**:D45–D49.

**Lévesque C, Duplessis M, Labonté J, Labrie S, Fremaux C, Tremblay D, and Moineau S** (2005) Genomic Organization and Molecular Analysis of Virulent Bacteriophage 2972 Infecting an Exopolysaccharide-Producing *Streptococcus thermophilus* Strain. *Appl Environ Microbiol* **71**:4057–4068.

**Levy SB, and Marshall B** (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* **10**:S122–S129.



- Lewis JA, and Hatfull GF** (2001) Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins. *Nucleic Acids Res* **29**:2205–2216.
- Lillehaug D** (1997) An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. *J Appl Microbiol* **83**:85–90.
- Lima-Mendez G, Helden JV, Toussaint A, and Leplae R** (2008) Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **24**:863–865.
- Lonvaud-Funel A** (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **199**:9–13.
- Lonvaud-Funel A** (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, in *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* pp 317–331, Springer.
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, and Desens C** (1988) Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J Sci Food Agric* **44**:183–191.
- LONVAUD-FUNEL, RENOUF, and STREHAIANO** (2010) *Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications*, Lavoisier.
- Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T, and Hugenholtz J** (2001) Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* **64**:71–80.
- Łoś M, and Węgrzyn G** (2012) Chapter 9 - Pseudolysogeny, in *Advances in Virus Research* (Małgorzata Łobocka and Waclaw T. Szybalski ed) pp 339–349, Academic Press.
- Los M, Węgrzyn G, and Neubauer P** (2003) A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells. *Res Microbiol* **154**:547–552.
- Lucas PM, Claisse O, and Lonvaud-Funel A** (2008) High Frequency of Histamine-Producing Bacteria in the Enological Environment and Instability of the Histidine Decarboxylase Production Phenotype. *Appl Environ Microbiol* **74**:811–817.
- Lucchini S, Desiere F, and Brüßow H** (1999a) Comparative Genomics of *Streptococcus thermophilus* Phage Species Supports a Modular Evolution Theory. *J Virol* **73**:8647–8656.
- Lucchini S, Desiere F, and Brüßow H** (1999b) Similarly Organized Lysogeny Modules in Temperate *Siphoviridae* from Low GC Content Gram-Positive Bacteria. *Virology* **263**:427–435.
- Lunde M, Blatny JM, Kaper F, Nes IF, and Lillehaug D** (2000) The life cycles of the temperate lactococcal bacteriophage  $\phi$ LC3 monitored by a quantitative PCR method. *FEMS Microbiol Lett* **192**:119–124.
- Luria SE, and Anderson TF** (1942) The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **28**:127–130.1.
- Lu Z, Altermann E, Breidt F, and Kozyavkin S** (2010) Sequence Analysis of *Leuconostoc mesenteroides* Bacteriophage  $\Phi$ 1-A4 Isolated from an Industrial Vegetable Fermentation. *Appl Environ Microbiol* **76**:1955–1966.
- Lwoff A, Horne R, and Tournier P** (1962) A System of Viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**:51–55.
- Ly-Chatain MH, Durand L, Rigobello V, Ronique, Vera A, and Demarigny Y** (2011) Direct Quantitative Detection and Identification of Lactococcal Bacteriophages from Milk and Whey by Real-Time PCR: Application for the Detection of Lactococcal Bacteriophages in Goat's Raw Milk Whey in France. *Int J Microbiol* **2011**.



**M**

- Madsen A, and Josephsen J** (2001) The LlaGI restriction and modification system of *Lactococcus lactis* W10 consists of only one single polypeptide. *FEMS Microbiol Lett* **200**:91–96.
- Mahony J, Ainsworth S, Stockdale S, and van Sinderen D** (2012) Phages of lactic acid bacteria: The role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology* **434**:143–150.
- Mahony J, Bottacini F, van Sinderen D, and Fitzgerald GF** (2014) Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microb Cell Factories* **13**:S1.
- Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, and Sinderen D van** (2008) Identification and Characterization of Lactococcal-Prophage-Carried Superinfection Exclusion Genes. *Appl Environ Microbiol* **74**:6206–6215.
- Malherbe S, Tredoux AGJ, Nieuwoudt HH, and Toit M du** (2012) Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**:477–494.
- Marcobal A, de las Rivas B, Moreno-Arribas MV, and Munoz R** (2006) Evidence for Horizontal Gene Transfer as Origin of Putrescine Production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl Environ Microbiol* **72**:7954–7958.
- Marcobal AM, Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, and Mills DA** (2007) Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J Bacteriol* **190**:564–570.
- Markine-Goriaynoff N** (2004) Glycosyltransferases encoded by viruses. *J Gen Virol* **85**:2741–2754.
- Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG, and Sulakvelidze A** (2002) A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol* **41**:453–458.
- Martinez-Castillo A, and Muniesa M** (2014) Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* **4**:46.
- Martinez JL, Sánchez MB, Martínez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, and Alvarez-Ortega C** (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**:430–449.
- Martinez-Murcia AJ, and Collins MD** (1990) A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* **58**:73–83.
- Martín R, Escobedo S, and Suárez JE** (2010) Induction, structural characterization, and genome sequence of Lv1, a prophage from a human vaginal *Lactobacillus jensenii* strain. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **13**:113–121.
- Martins G, Lauga B, Miot-Sertier C, Mercier A, Lonvaud A, Soulas M-L, Soulas G, and Masneuf-Pomarède I** (2013) Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE* **8**:e73013.
- Matias AA, Serra AT, Silva AC, Perdigão R, Ferreira TB, Marcelino I, Silva S, Coelho AV, Alves PM, and Duarte CMM** (2010) Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *Int J Food Sci Nutr* **61**:357–368.





- Matos RC, Lapaque N, Rigottier-Gois L, Debarbieux L, Meylheuc T, Gonzalez-Zorn B, Repoila F, Lopes M de F, and Serror P** (2013) *Enterococcus faecalis* Prophage Dynamics and Contributions to Pathogenic Traits. *PLoS Genet* **9**:e1003539.
- McGrath S, Fitzgerald GF, and Sinderen D van** (2002) Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol Microbiol* **43**:509–520.
- McKittrick NH, and Smith GR** (1989) Activation of Chi recombinational hotspots by RecBCD-like enzymes from enteric bacteria. *J Mol Biol* **210**:485–495.
- Meessen-Pinard M, Sekulovic O, and Fortier L-C** (2012) Evidence of In Vivo Prophage Induction during *Clostridium difficile* Infection. *Appl Environ Microbiol* **78**:7662–7670.
- Menard KL, and Grossman AD** (2013) Selective Pressures to Maintain Attachment Site Specificity of Integrative and Conjugative Elements. *PLoS Genet* **9**:e1003623.
- Merril CR, Scholl D, and Adhya SL** (2003) The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* **2**:489–497.
- Millen AM, Horvath P, Boyaval P, and Romero DA** (2012) Mobile CRISPR/Cas-Mediated Bacteriophage Resistance in *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE* **7**:e51663.
- Miller RV, and Day MJ** (2004) *Microbial evolution: gene establishment, survival, and exchange*, ASM Press, Washington, DC.
- Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, Tamir D, and Makarova K** (2005) Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol Rev* **29**:465–475.
- Mills S, Coffey A, McAuliffe OE, Meijer WC, Hafkamp B, and Ross RP** (2007) Efficient method for generation of bacteriophage insensitive mutants of *Streptococcus thermophilus* yoghurt and mozzarella strains. *J Microbiol Methods* **70**:159–164.
- Mills S, Griffin C, O’Sullivan O, Coffey A, McAuliffe OE, Meijer WC, Serrano LM, and Ross RP** (2011) A new phage on the “Mozzarella” block: Bacteriophage 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *Int Dairy J* **21**:963–969.
- Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, and Ross RP** (2013) Movers and shakers. *Gut Microbes* **4**:4–16.
- Mocé-Llivina L, Jofre J, and Muniesa M** (2003) Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions. *J Virol Methods* **109**:99–101.
- Moisan M, and Moineau S** (2012) Multilocus Sequence Typing Scheme for the Characterization of 936-Like Phages Infecting *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **78**:4646–4653.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, and Soria E** (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**:174–182.
- Molloy S** (2012) Bacterial pathogenicity: A competent escape for *Listeria*. *Nat Rev Microbiol* **10**:670–670.
- Monod C, Repoila F, Kutateladze M, Tétart F, and Krisch HM** (1997) The genome of the pseudo T-even bacteriophages, a diverse group that resembles T4. *J Mol Biol* **267**:237–249.
- Munsch-Alatossava P, and Alatossava T** (2013) The extracellular phage-host interactions involved in the bacteriophage LL-H infection of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 15808. *Front Microbiol* **4**.



**Murphy J, Mahony J, Ainsworth S, Nauta A, and Sinderen D van** (2013) Bacteriophage Orphan DNA Methyltransferases: Insights from Their Bacterial Origin, Function, and Occurrence. *Appl Environ Microbiol* **79**:7547–7555.

**Murray NE** (2000) Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:412–434.

**Muzaffar R, Batool S, Aziz F, Naqvi A, and Rizvi A** (2002) Evaluation of the FASTPlaqueTB assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**:635–640.

### N, O, P

**Nakagawa I, Kurokawa K, Yamashita A, Nakata M, Tomiyasu Y, Okahashi N, Kawabata S, Yamazaki K, Shiba T, Yasunaga T, Hayashi H, Hattori M, and Hamada S** (2003) Genome Sequence of an M3 Strain of *Streptococcus pyogenes* Reveals a Large-Scale Genomic Rearrangement in Invasive Strains and New Insights into Phage Evolution. *Genome Res* **13**:1042–1055.

**Nascimento JG, Guerreiro-Pereira MC, Costa SF, São-José C, and Santos MA** (2008) Nisin-triggered activity of Lys44, the secreted endolysin from *Oenococcus oeni* phage fOg44. *J Bacteriol* **190**:457–461.

**Nejman-Falenczyk B, Golec P, Maciag M, Wegrzyn A, and Wegrzyn G** (2012) Inhibition of Development of Shiga Toxin-Converting Bacteriophages by Either Treatment with Citrate or Amino Acid Starvation. *Foodborne Pathog Dis* **9**:13–19.

**Nel L, Wingfield BD, van der Meer LJ, and van Vuuren H j. j.** (1987) Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* bacteriophages from wine and sugarcane. *FEMS Microbiol Lett* **44**:63–67.

**Nesper J, Blaß J, Fountoulakis M, and Reidl J** (1999) Characterization of the Major Control Region of *Vibrio cholerae* Bacteriophage K139: Immunity, Exclusion, and Integration. *J Bacteriol* **181**:2902–2913.

**Nguyen SV, and McShan WM** (2014) Chromosomal islands of *Streptococcus pyogenes* and related streptococci: molecular switches for survival and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **4**.

**Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, and van Leeuwen PA** (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**:418–425.

**Nilsson AS** (2014) Phage therapy—constraints and possibilities. *Ups J Med Sci* **119**:192–198.

**Novick RP, Christie GE, and Penadés JR** (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**:541–551.

**Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, Watanabe T, Haobam B, Kurokawa K, Maruyama F, and Nakagawa I** (2011) CRISPR Inhibition of Prophage Acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS ONE* **6**:e19543.

**Oliveira M, Viñas I, Colàs P, Anguera M, Usall J, and Abadias M** (2014) Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiol* **38**:137–142.

**Pasteur L** (1873) *Études sur le vin, ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir*, Paris : F. Savy.

**Paul JH** (2008) Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J* **2**:579–589.

**Pei X-Y, Dai Y, Youssefian LE, Chen S, Bodie WW, Takabatake Y, Felthousen J, Almenara JA, Kramer LB, Dent P, and Grant S** (2011) Cytokinetically quiescent (G0/G1) human multiple myeloma cells are susceptible to simultaneous inhibition of Chk1 and MEK1/2. *Blood* **118**:5189–5200.



- Pinto C, Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, and C. Gomes A** (2014) Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE* **9**:e85622.
- Poblet-Icart M, Bordons A, and Lonvaud-Funel A** (1998) Lysogeny of *Oenococcus oeni* (syn. *Leuconostoc oenos*) and study of their induced bacteriophages. *Curr Microbiol* **36**:365–369.
- Popa O, and Dagan T** (2011) Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **14**:615–623.
- Prangishvili D** (2013) The Wonderful World of Archaeal Viruses. *Annu Rev Microbiol* **67**:565–585.
- Prangishvili D, Forterre P, and Garrett RA** (2006) Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Microbiol* **4**:837–848.
- Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA, Loomer P, Armitage GC, and Relman DA** (2012) Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J* **6**:915–926.
- Projan S** (2004) Phage-inspired antibiotics? *Nat Biotechnol* **22**:167–168.
- Proux C, Sinderen D van, Suarez J, Garcia P, Ladero V, Fitzgerald GF, Desiere F, and Brüssow H** (2002) The Dilemma of Phage Taxonomy Illustrated by Comparative Genomics of Sfi21-Like *Siphoviridae* in Lactic Acid Bacteria. *J Bacteriol* **184**:6026–6036.
- Prunier A-L, and Leclercq R** (2005) Role of mutS and mutL Genes in Hypermutability and Recombination in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:3455–3464.
- Ptashne M** (1992) *A Genetic Switch: Phage [lambda] and Higher Organisms*, Cell Press.
- Pujato SA, Guglielmotti DM, Ackermann H-W, Patrignani F, Lanciotti R, Reinheimer JA, and Quiberoni A** (2014) Leuconostoc bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *Int J Food Microbiol* **177**:81–88.

## Q, R

- Quiberoni A, Stiefel JI, and Reinheimer JA** (2000) Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. *J Appl Microbiol* **89**:1059–1065.
- Quiles-Puchalt N, Tormo-Mas MA, Campoy S, Toledo-Arana A, Monedero V, Lasa I, Novick RP, Christie GE, and Penades JR** (2013) A super-family of transcriptional activators regulates bacteriophage packaging and lysis in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* **41**:7260–7275.
- Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Nir-Paz R, and Herskovits AA** (2012) Prophage Excision Activates *Listeria* Competence Genes that Promote Phagosomal Escape and Virulence. *Cell* **150**:792–802.
- Raisanen L, Draing C, Pfitzenmaier M, Schubert K, Jaakonsaari T, von Aulock S, Hartung T, and Alatossava T** (2007) Molecular Interaction between Lipoteichoic Acids and *Lactobacillus delbrueckii* Phages Depends on d-Alanyl and Glucose Substitution of Poly(Glycerophosphate) Backbones. *J Bacteriol* **189**:4135–4140.
- Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, and Novik GI** (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol Pol Tow Mikrobiol Pol Soc Microbiol* **59**:145–155.
- Rausch H, and Lehmann M** (1991) Structural analysis of the actinophage phi C31 attachment site. *Nucleic Acids Res* **19**:5187–5189.



- Ravin V, Raisanen L, and Alatosava T** (2002) A Conserved C-Terminal Region in Gp71 of the Small Isometric-Head Phage LL-H and ORF474 of the Prolate-Head Phage JCL1032 Is Implicated in Specificity of Adsorption of Phage to Its Host, *Lactobacillus delbrueckii*. *J Bacteriol* **184**:2455–2459.
- Reardon S** (2014) Phage therapy gets revitalized. *Nature* **510**:15–16.
- Refardt D** (2011) Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *ISME J* **5**:1451–1460.
- Renouf V, and Murat M-L** (2008) L'utilisation de levains malolactiques pour une meilleure maîtrise du risque *Brettanomyces*. *Rev Oenologues Tech Vitivinic Oenologicques Mag Trimest Inf Prof* **35**:11–14.
- Rini J, Esko J, and Varki A** (2009) Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes, in *Essentials of Glycobiology* (Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, and Etzler ME eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Ripp S, and Miller RV** (1998) Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **144**:2225–2232.
- Ripp S, and Miller RV** (1997) The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* **143**:2065–2070.
- Rocha EPC, and Danchin A** (2003) Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**:6570–6577.
- Rodas AM, Chenoll E, Macián MC, Ferrer S, Pardo I, and Aznar R** (2006) *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:513–517.
- Rohwer F, and Edwards R** (2002) The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage. *J Bacteriol* **184**:4529–4535.

## S

- Sambrook J, and Russell DW** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press.
- Samson JE, and Moineau S** (2013) Bacteriophages in Food Fermentations: New Frontiers in a Continuous Arms Race. *Annu Rev Food Sci Technol* **4**:347–368.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, and Smith M** (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**:687–695.
- Santos R, São-José C, Vieira G, Paveia H, and Santos MA** (1998) Genome diversity in temperate bacteriophages of *Oenococcus oeni*. *Arch Virol* **143**:523–536.
- Santos R, Vieira G, Santos M a., and Paveia H** (1996) Characterization of temperate bacteriophages of *Leuconostoc oenos* and evidence for two prophage attachment sites in the genome of starter strain PSU-1. *J Appl Bacteriol* **81**:383–392.
- Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, and Azeredo J** (2009) The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol* **9**:148.
- São-José C, Parreira R, Vieira G, and Santos MA** (2000) The N-Terminal Region of the *Oenococcus oeni* Bacteriophage fOg44 Lysin Behaves as a Bona Fide Signal Peptide in *Escherichia coli* and as a cis-Inhibitory Element, Preventing Lytic Activity on Oenococcal Cells. *J Bacteriol* **182**:5823–5831.





- São-José C, Santos S, Nascimento J, Brito-Madurro AG, Parreira R, and Santos MA (2004) Diversity in the lysis-integration region of oenophage genomes and evidence for multiple tRNA loci, as targets for prophage integration in *Oenococcus oeni*. *Virology* **325**:82–95.
- Sato K, and Campbell A (1970) Specialized transduction of galactose by lambda phage from a deletion lysogen. *Virology* **41**:474–487.
- Scherzinger E, Lanka E, and Hillenbrand G (1977) Role of bacteriophage T7 DNA primase in the initiation of DNA strand synthesis. *Nucleic Acids Res* **4**:4151–4163.
- Schmelcher M, and Loessner MJ (2014) Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* **4**.
- Sciara G, Bebeacua C, Bron P, Tremblay D, Ortiz-Lombardia M, Lichiere J, van Heel M, Campanacci V, Moineau S, and Cambillau C (2010) Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci* **107**:6852–6857.
- Scott J, Thompson-Mayberry P, Lahmamsi S, King CJ, and McShan WM (2008) Phage-Associated Mutator Phenotype in Group A *Streptococcus*. *J Bacteriol* **190**:6290–6301.
- Serwer P, Hayes SJ, Thomas JA, and Hardies SC (2007) Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class. *Virology* **4**:21.
- Sharma M (2013) Lytic bacteriophages. *Bacteriophage* **3**.
- Shiba S, Terawaki A, Taguchi T, and Kawamata J (1959) Selective Inhibition of Formation of Deoxyribonucleic Acid in *Escherichia coli* by Mitomycin C. *Publ Online 11 April 1959 Doi1010381831056a0* **183**:1056–1057.
- Shin H, Lee J-H, Kim H, Choi Y, Heu S, and Ryu S (2012) Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *PLoS ONE* **7**:e43392.
- Siezen R, Boekhorst J, Muscariello L, Molenaar D, Renckens B, and Kleerebezem M (2006) *Lactobacillus plantarum* gene clusters encoding putative cell-surface protein complexes for carbohydrate utilization are conserved in specific gram-positive bacteria. *BMC Genomics* **7**:126.
- Sillankorva S, Oliveira R, Vieira MJ, Sutherland I, and Azeredo J (2004) *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage PhiS1: the influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiol Lett* **241**:13–20.
- Simon, Martha N., Ronald W. Davis, and Norman Davidson (1971) Heteroduplexes of DNA molecules of lambdoid phages: physical mapping of their base sequence relationships by electron microscopy, in *Heteroduplexes of DNA molecules of lambdoid phages: physical mapping of their base sequence relationships by electron microscopy*.
- Smith KC, Castro-Nallar E, Fisher JN, Breakwell DP, Grose JH, and Burnett SH (2013) Phage cluster relationships identified through single gene analysis. *BMC Genomics* **14**:410.
- Soni KA, and Nannapaneni R (2010) Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J Food Prot* **73**:32–38.
- Souza RB de, Santos BM dos, Souza R de FR de, Silva PKN da, Lucena BTL, and Jr MA de M (2012) The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**:1645–1650.
- Sozzi T, D'Amico N, Hose H, and Gnaegi F (1982) Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bacteriophage de *Leuconostoc oenos*. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic*.



- Sozzi T, Maret R, and Poulin JM** (1976) Mise en évidence de bactériophages dans le vin observation of bacteriophages in wine. *Experientia* **32**:568–569.
- Stanley EC, Mole RJ, Smith RJ, Glenn SM, Barer MR, McGowan M, and Rees CED** (2007) Development of a New, Combined Rapid Method Using Phage and PCR for Detection and Identification of Viable *Mycobacterium paratuberculosis* Bacteria within 48 Hours. *Appl Environ Microbiol* **73**:1851–1857.
- Stella EJ, Franceschelli JJ, Tasselli SE, and Morbidoni HR** (2013) Analysis of Novel Mycobacteriophages Indicates the Existence of Different Strategies for Phage Inheritance in Mycobacteria. *PLoS ONE* **8**:e56384.
- Stern A, and Sorek R** (2011) The phage-host arms-race: Shaping the evolution of microbes. *Bioessays* **33**:43–51.
- Stockdale SR, Mahony J, Courtin P, Chapot-Chartier M-P, van Pijkeren J-P, Britton RA, Neve H, Heller KJ, Aideh B, Vogensen FK, and van Sinderen D** (2013) The Lactococcal Phages Tuc2009 and TP901-1 Incorporate Two Alternate Forms of Their Tail Fiber into Their Virions for Infection Specialization. *J Biol Chem* **288**:5581–5590.
- Stone R** (2002) Stalin's Forgotten Cure. *Science* **298**:728–731.
- Sturino JM, and Klaenhammer TR** (2004) Bacteriophage Defense Systems and Strategies for Lactic Acid Bacteria, in *Advances in Applied Microbiology* pp 331–378, Academic Press.
- Suárez VB, and Reinheimer JA** (2002) Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *J Food Prot* **65**:1756–1759.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, and Morris JG** (2001) Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:649–659.
- Sullivan MJ, Petty NK, and Beatson SA** (2011) Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**:1009–1010.
- Sun X, Göhler A, Heller KJ, and Neve H** (2006) The ltp gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology* **350**:146–157.
- Suttle CA, and Fuhrman JA** (2010) Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy, in *Manual of Aquatic Viral Ecology* (Wilhelm S, Weinbauer M, and Suttle C eds) pp 145–153, American Society of Limnology and Oceanography.
- Swint-Kruse L, and Matthews KS** (2009) Allostery in the LacI/GalR Family: Variations on a Theme. *Curr Opin Microbiol* **12**:129–137.
- Switt AIM, Orsi RH, Bakker HC den, Vongkamjan K, Altier C, and Wiedmann M** (2013) Genomic characterization provides new insight into Salmonella phage diversity. *BMC Genomics* **14**:481.
- Szczepankowska AK, Gorecki RK, Koakowski P, and Bardowski JK** (2013) Lactic Acid Bacteria Resistance to Bacteriophage and Prevention Techniques to Lower Phage Contamination in Dairy Fermentation, in *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (Kongo JM ed), InTech.

## I

- Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, and Godelle B** (1997) Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**:700–702.



- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S** (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**:2731–2739.
- Tenreiro R, Santos R, Brito L, Paveia H, Vieira G, and Santos M a.** (1993) Bacteriophages induced by mitomycin C treatment of *Leuconostoc oenos* strains from Portuguese wines. *Lett Appl Microbiol* **16**:207–209.
- Teresa Pellicer M, Felisa Nuñez M, Aguilar J, Badia J, and Baldoma L** (2003) Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. *J Bacteriol* **185**:5815–5821.
- Thingstad TF** (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol Oceanogr* **45**:1320–1328.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, and Pallen MJ** (2006) An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci* **103**:14941–14946.
- Tock MR, and Dryden DT** (2005) The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* **8**:466–472.
- Torriani S, Felis GE, and Fracchetti F** (2011) Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Ann Microbiol* **61**:33–39.
- Tour H,** (2010) *Echanges génétiques entre la bactérie lactique Oenococcus oeni et son environnement: contribution des bactériophages et des séquences d'insertion.* Rapport final de DUT 2<sup>ème</sup> année, IUT de Mont de Marsan.
- Tracey RP, and Britz TJ** (1987) A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. *J Appl Bacteriol* **63**:523–532.
- Tremblay DM, and Moineau S** (1999) Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of *Streptococcus thermophilus*. *Virology* **255**:63–76.
- Tuohimaa A, Riipinen K-A, Brandt K, and Alatosava T** (2006) The genome of the virulent phage Lc-Nu of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, and comparative genomics with *Lactobacillus casei* phages. *Arch Virol* **151**:947–965.
- Twort FW** (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* **186**:1241–1243.

### U, V, W

- Vandamme EJ** (2014) Phage therapy and phage control: to be revisited urgently!!: Phage therapy and phage control. *J Chem Technol Biotechnol* **89**:329–333.
- Ventura M, Canchaya C, Kleerebezem M, de Vos WM, Siezen RJ, and Brüssow H** (2003) The prophage sequences of *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1. *Virology* **316**:245–255.
- Ventura M, Canchaya C, Pridmore RD, and Brüssow H** (2004) The prophages of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533: comparative genomics and transcription analysis. *Virology* **320**:229–242.
- Verbeken G, Pirnay J-P, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, and Huys I** (2014) Call for a Dedicated European Legal Framework for Bacteriophage Therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **62**:117–129.
- Villion M, and Moineau S** (2013) Virology: Phages hijack a host's defence. *Nature* **494**:433–434.



- Viruses IC on N of, and Wildy P** (1971) *Classification and nomenclature of viruses: first report [by] Peter Wildy, Karger.*
- Volkin E, and Astrachan L** (1956) Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* **2**:149–161.
- Waldman AS, Goodman SD, and Scocca JJ** (1987) Nucleotide sequences and properties of the sites involved in lysogenic insertion of the bacteriophage HP1c1 genome into the *Haemophilus influenzae* chromosome. *J Bacteriol* **169**:238–246.
- Waldor MK, and Mekalanos JJ** (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**:1910–1914.
- Walling E, Gindreau E, and Lonvaud-Funel A** (2005) A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int J Food Microbiol* **98**:53–62.
- Wang G, and Maier RJ** (2004) An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun* **72**:1391–1396.
- Wang I-N, Smith DL, and Young R** (2000) HOLINS: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. *Annu Rev Microbiol* **54**:799–825.
- Wang X-G, Olsen LR, and Roderick SL** (2002) Structure of the *lac* operon galactoside acetyltransferase. *Struct Lond Engl* **10**:581–588.
- Weinitschke S, Denger K, Cook AM, and Smits THM** (2007) The DUF81 protein TauE in *Cupriavidus necator* H16, a sulfite exporter in the metabolism of C2 sulfonates. *Microbiology* **153**:3055–3060.
- Werning ML, Ibarburu I, Dueñas MT, Irastorza A, Navas J, and López P** (2006) *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of beta-D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *J Food Prot* **69**:161–169.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, and Mattick JS** (2002) Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **295**:1487–1487.
- Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ** (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**:6578–6583.
- Williams KP** (2002) Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res* **30**:866–875.
- Wilson GW, and Edgell DR** (2009) Phage T4 *mobE* promotes trans homing of the defunct homing endonuclease I-TevIII. *Nucleic Acids Res* **37**:7110–7123.
- Wommack KE, and Colwell RR** (2000) Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:69–114.

### X, Y, Z

- Yang D, and Woese CR** (1989) Phylogenetic Structure of the “*Leuconostocs*”: An Interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. *Syst Appl Microbiol* **12**:145–149.
- Yasmin A, Kenny JG, Shankar J, Darby AC, Hall N, Edwards C, and Horsburgh MJ** (2010) Comparative Genomics and Transduction Potential of *Enterococcus faecalis* Temperate Bacteriophages. *J Bacteriol* **192**:1122–1130.





- Yasuda E, Tateno H, Hirabarashi J, Iino T, and Sako T** (2011) Lectin Microarray Reveals Binding Profiles of *Lactobacillus casei* Strains in a Comprehensive Analysis of Bacterial Cell Wall Polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **77**:4539–4546.
- Young R** (2014) Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* **52**:243–258.
- Zago M, Rossetti L, Reinheimer J, Carminati D, and Giraffa G** (2008) Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *J Dairy Res* **75**.
- Zé-Zé L, Chelo IM, and Tenreiro R** (2008) Genome organization in *Oenococcus oeni* strains studied by comparison of physical and genetic maps. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* **11**:237–244.
- Zhang H, Fouts DE, DePew J, and Stevens RH** (2013) Genetic modifications to temperate *Enterococcus faecalis* phage Ef11 that abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. *Microbiol Read Engl* **159**:1023–1035.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, and Wishart DS** (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res* gkr485.
- Zúñiga M, Pardo I, and Ferrer S** (1996) Transposons Tn916 and Tn925 can transfer from *Enterococcus faecalis* to *Leuconostoc oenos*. *FEMS Microbiol Lett* **135**:179–185.



# **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**



## Publications dans des journaux à comité de lecture

**Jaomanjaka F, Ballestra P, Dols-lafargue M, and Le Marrec C** (2013) Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: insights into a novel group based on the integrase sequence. *Int J Food Microbiol* **166**:331–340.

**Jaomanjaka F, Claisse O, Petrel M, and Le Marrec C** (soumis) Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*.

## Communication orale

**Jaomanjaka, F., Claisse, O., Le Marrec, C.** Bactériophages et vinification : Diversité génétique des prophages identifiés chez la bactérie lactique *Oenococcus oeni*. 19ème édition du Club des Bactéries Lactiques, Bordeaux, France, Octobre 2013.

## Communications affichées

**Jaomanjaka, F., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Tremblay, D., Moineau, S. and C. Le Marrec** (2013). Diversité génétique des prophages identifiés chez la bactérie lactique *Oenococcus oeni*. Congrès de la SFM, Lille.

**Jaomanjaka, F., Claisse, O., Petrel., M. and C. Le Marrec** (2014). Malolactic fermentation of wines : a little taste of phages. 3ème congrès international des "Viruses of Microbes" ,Zurich, Suisse, Juillet 2014.









## **Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins**

Les bactériophages sont de puissants prédateurs bactériens. Leur développement est généralement redouté dans les industries agro-alimentaires mettant en oeuvre des fermentations, car les phages sont responsables d'accidents de fabrication affectant la qualité finale du produit. Leur impact lors de la vinification est moins bien défini. Le procédé comporte une étape de fermentation malolactique (FML), qui est assurée par la bactérie lactique *Oenococcus oeni*. La maîtrise de la FML est un moyen efficace pour protéger la qualité et la typicité des vins, vecteurs de commercialisation. Jusqu'à présent, cette étape fondamentale du processus de vinification n'est pas toujours maîtrisée. L'explication majeure réside dans l'insuffisance de la biomasse bactérienne endogène, liée aux conditions physico-chimiques difficiles du milieu. Des solutions visant à conduire rapidement la FML sont disponibles, comme l'inoculation de souches commerciales de *O. oeni*. Ces stratégies n'offrent toutefois pas une totale garantie de succès, et des retards ou non déclenchements de FML sont toujours observés. Ces situations inexplicables amènent à s'interroger sur l'impact d'autres paramètres sur la fermentescibilité malolactique. L'objectif de cette thèse était d'évaluer la présence et la diversité des bactériophages antagonistes de la bactérie lactique *O. oeni* présents dans l'écosystème. La diversité des prophages présents dans le pangéome de *O. oeni* a été explorée. La lysogénie est fréquente dans l'espèce. Quatre groupes de prophages ont été identifiés sur la base de la séquence de l'intégrase, et du site de recombinaison site-spécifique utilisé. La pertinence de la classification établie a été vérifiée sur un panel de 40 phages isolés de moûts et de vins. Nos travaux suggèrent que la lysogénie est un moyen pour *O. oeni* de résister aux stress et aux phages, grâce à la présence de mécanismes de résistance sur les génomes prophagiques. La stabilité de la lysogénie lors de l'inoculation de souches lysogènes dans le vin et la possible libération de dérivés lytiques sont deux paramètres à prendre en compte lors des FML spontanées, et lors de l'inoculation de levains malolactiques. Ils sont susceptibles de moduler quantitativement et qualitativement la population.

**Mots clés :** Bactéries lactiques, *Oenococcus oeni*, bactériophages, lysogénie, fermentation, vin

## **Diversity of bacteriophages infecting *Oenococcus oeni*, the lactic acid bacteria responsible for the wine malolactic fermentation**

Bacteriophages are responsible for the predation of bacteria. They pose an ever-present threat to the food industries because they invade and destroy the starter and affect production. Their destructive potential is currently difficult to establish during spontaneous production of wine. Malolactic fermentation (MLF) represents a main stage in the winemaking process, and is essentially driven by the lactic acid bacterium (LAB) *Oenococcus oeni*. A rapid and efficient FML is essential to optimize wine quality and typicity, as sales rely on top-quality products. Up to now, this essential step is not controlled, and this results from the limited growth of MLF bacteria in wine, due to stressing conditions. Inoculation of commercial bacterial starter cultures is a strategy to improve MLF control, and will allow a rapid and complete fermentation. However, despite these evolutions, sluggish or complete failures of MLF are still reported by wine farmers, either during spontaneous or directed fermentations. Such cases suggest that additional factors need to be identified. The outline of this thesis was to demonstrate the occurrence of phages infecting *O. oeni* in the ecosystem and provide essential information regarding phage diversity. We analyzed prophage diversity through comparative genomics and demonstrated that lysogeny is widespread. Four prophage groups were identified according to the integrase gene sequence and attachment site used for site specific recombination. The relevance of the classification scheme was verified through the analysis of a panel of 40 phages isolated from wine and must. We suggest that lysogeny helps *O. oeni* to cope with stress and phage attack, through the presence of specific anti-phage mechanisms harbored by the prophages. The stability of lysogens during inoculation in wine, and the possible release of lytic particles have to be considered during spontaneous or directed MLF. They are expected to shape the population.

**Keywords :** Lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni*, bacteriophages, lysogeny, fermentation, wine

**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**