Bactériophages infectant la bactérie lactique Oenococcus oeni : diversité et rôles dans l'écosystème oenologique

Cécile Philippe

▶ **To cite this version:**

Cécile Philippe. Bactériophages infectant la bactérie lactique Oenococcus oeni : diversité et rôles dans l'écosystème oenologique. Ingénierie des aliments. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0936 . tel-02426940

HAL Id: tel-02426940
https://theses.hal.science/tel-02426940

Submitted on 3 Jan 2020

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.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Œnologie

Par Cécile PHILIPPE

Bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*: diversité et rôles dans l'écosystème œnologique

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

Soutenue le 19 décembre 2017

Membres du jury :

M. Gilles de REVEL	Professeur à l'Université de Bordeaux	Président de jury
Mme. Catherine FONTAGNE-FAUCHER	Professeur à l'Université de Toulouse	Rapportrice
Mme. Nathalie LEBLOND-BOURGET	Professeur à l'Université de Lorraine	Rapportrice
M. Dominique SCHNEIDER	Professeur à l'Université de Grenoble	Examinateur
Mme Stéphanie CLUZET	Maître de conférences à l'Université de Bordeaux	Co-directrice de thèse
Mme Claire LE HENAFF-LE MARREC	Professeur à l'INP Bordeaux Aquitaine, HDR	Directrice de thèse

Bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni* : diversité et rôles dans l'écosystème œnologique

Les bactériophages (ou phages) sont des prédateurs de bactéries et sont redoutés dans les productions agro-alimentaires mettant en œuvre des fermentations. En œnologie, la transformation du jus de raisin en vin fait appel à différents types de fermentation. La fermentation alcoolique est réalisée par des levures, et peut être suivie par une fermentation malolactique (FML), notamment pour les vins rouges, afin d'améliorer la stabilité microbiologique et les qualités organoleptiques du produit. La bactérie lactique Œ*nococcus oeni (O.* œ*ni)* appartient à la famille des *Leuconostocaceae* et est l'acteur principal de la FML. Des souches d'*O. oeni* sont utilisées comme levain malolactique, et inoculées dans le vin pour mieux maîtriser les fermentations. *O. oeni* rencontre dans son environnement des phages spécifiques appelés œnophages. Toutefois, bien que la présence de ces œnophages ait été constatée, leur diversité reste à ce jour peu explorée, tout comme leurs implications dans l'élaboration du vin. Une fréquence élevée de la lysogénie a été observée dans l'espèce et parmi les levains commercialisés. Les risques associés à la présence de phages ou à la lysogénie sont des paramètres peu abordés dans la filière. Afin de répondre à ces interrogations, dans un premier axe, la diversité des œnophages a été étudiée en isolant des phages à partir d'une large collecte d'échantillons œnologiques menée dans le sud-ouest de la France. L'analyse d'échantillons de différents types de vin, de différents cépages, collectés à différentes étapes de la vinification nous a permis de mettre en lumière une diversité génomique des oenophages non suspectée. Nous avons initié le développement de nouveaux outils moléculaires pour étudier la dynamique des populations bactériennes et phagiques dans le contexte œnologique. Ainsi, une première approche par Digital Droplet PCR a été utilisée pour détecter et quantifier les populations lysogènes. Dans un deuxième axe, l'interaction phage-hôte en présence de composés phénoliques du vin a été étudiée. Les travaux suggèrent que la croissance *d'O. oeni* en présence de certains flavonols et acides phénoliques réduit la capacité d'adsorption des phages sur leur hôte.

Mots clés : *Oenococcus oeni*, bactériophages, lysogénie, vin, composés phénoliques, fermentation malolactique

Bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* : diversity and roles in the enological ecosystem

Bacteriophages are viral predators of bacteria and a major concern in fermentations involved in food processing industry. In winemaking, transformation of grape juice into wine involves different types of fermentations. Alcoholic fermentation is driven by yeasts, and can be followed by malolactic fermentation (MLF), especially for red wines, which can improve microbial stability and sensorial quality of wine. The lactic acid bacterium Œ*nococcus oeni (O.* œ*ni)*, member of *Leuconostocacae* family, is generally responsible for the MLF process. Strains of *O.* œ*ni* are also used as starters to master MLF. *O. oeni* encounters specific phages called oenophages. Even though the presence of oenophages has been observed, their diversity remains poorly investigated, just like their implications in winemaking. However, high frequency of lysogeny has been observed among *O. oeni* strains and starters. Risks linked with the presence of phages and lysogeny are questionned in the sector. In the first part of this thesis, oenophages diversty has been studied with the isolation of a large number of phages during the collection of a broad range of oenological samples in South West France. Analysis of samples coming from different wine types and varieties, collected at different steps of winemaking enabled us to highlight an underestimated genomic diversity. We also initiated the development of new molecular tools to study population dynamics among phages and hosts in the winemaking context. Thus, a first approach by Digital Droplet PCR has been used to detect and quantify lysogenic strains. In the second part, phage-host interactions in the presence of wine phenolic compound were investigated. Our results suggest that growth of *O.oeni* cells in the presence of particular flavonols and phenolic acids reduces adsorption capacities of phages on their host.

Keywords : *Oenococcus oeni,* bacteriophages, lysogeny, wine, phenolic compounds, malolactic fermentation

Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366, INRA
Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer ces travaux malgré leurs emplois du temps chargés : Catherine Faucher, Nathalie Leblond, Dominique Schneider et Gilles de Revel.

J'adresse ensuite un grand merci à mes encadrantes Claire Le Hénaff-Le Marrec et Stéphanie Cluzet, qui m'ont formée, soutenue et accompagnée durant ces trois années. Leur encadrement m'a permis de gagner en rigueur et maturité scientifique. Claire, je te remercie tout particulièrement pour ton implication, ta disponibilité, ta pédagogie et de m'avoir transmis ta passion pour les phages. Ton honnêteté et tes conseils m'ont poussé à m'améliorer constamment et pour cela je t'en remercie. Stéphanie, merci pour ta disponibilité, ta bienveillance et ton enthousiasme rassurant.

Je tiens également à dire chaleureusement merci à Fety Jaomanjaka (FiestaJ dans son temps libre). Merci pour ton implication et ton aide continues au cours de ces trois années, à la paillasse comme à l'interprétation des résultats et pour les analyses bio-info, tu as été une vraie locomotive pour moi.

Ensuite, je souhaite remercier sincèrement l'ensemble des « permanents » de l'équipe pour leur accueil. Philippe, Warren, Margaux B., Marina, Marguerite, Patrick, Isabelle, Julie, Amélie, Olivier, Patricia, Cécile MS et Lucie, merci pour vos conseils et les discussions de ces trois dernières années.

Je remercie également les membres du consortium ANR LYSOPLUS : Valérie Gabriel, Hervé Robert, Coralie Coudray-Meunier, Sarah Chuzeville, Mai Huong Chatain, Stéphanie Weidmann-Desroche, Joana Coulon et Marion Favier pour nos échanges constructifs.

Je remercie la plateforme de séquençage de Bordeaux, avec Erwan Guichoux pour le séquençage des génomes de phage, ainsi que le responsable de la plateforme Transcriptome de Bordeaux, Thierry Leste-Lasserre, pour la mise en œuvre de la ddPCR. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet et d'avoir répondu à mes nombreuses questions. Un grand merci également à Melina Pétrel pour toutes les préparations et les clichés de microscopie électronique.

Je souhaite ensuite dire merci à Gaëlle Bringaud pour avoir été ma première stagiaire avec qui nous avons démarré le projet d'étude des phages de bactéries acétiques. Merci d'avoir été au moins aussi optimiste et enthousiaste que moi, et d'avoir isolé notre premier tectivirus. Je remercie également Luis, Mariana, Dimitri, Roxane, Irène, et Karin d'avoir permis d'avancer dans nos travaux et de m'avoir appris tant de choses sur la pédagogie. Ensuite, je remercie Amel pour son travail à mes côtés pendant ma dernière année. Je suis très heureuse que tu reprennes le flambeau sur les oenophages. Je te souhaite bonne route pour la suite même si je ne me fais aucun souci pour toi !

Je veux maintenant exprimer toute ma gratitude, toute mon amitié, et un très très grand merci à mes collègues de bureaux (car j'ai fait plusieurs bureaux) qui ont évidemment marqué mon quotidien et sont devenues mes amis. Mes « copines de thèse » en premier lieu : Margaux C, pour ton incommensurable

bonne humeur, ta générosité et toutes les chansons pourries que tu nous mets dans la tête, Alice, pour ta patience et ta douceur sans équivalent, Marion B., le dynamisme incarné, et Marta, notre bulgare positive préférée. Merci infiniment pour votre soutien, le partage de galères, les tasses de thé, les sorties piscine, les tags de paillasse, les bières du vendredi, et j'en passe ... Nos discussions, notre entraide et nos rigolades ont été pour moi un réel bonheur et un réel moteur. Je remercie également Nicolas (mon voisin de bureau à temps partiel), Maxime (pour m'avoir renommé), Maroula et Yulie (nos rayons de soleil helléniques), ainsi que Magali, Mariette, Marine T, Hugo et Marc pour leur soutien.

J'aimerais également remercier mon maître de stage de Master, au LISBP à Toulouse, Mickaël Castelain pour m'avoir transmis l'envie de faire de la recherche. Je remercie l'équipe EAD4 du LISBP pour m'avoir donné confiance en moi pour réaliser cette thèse. En particulier, merci à Manon pour son soutien depuis San Diego, et Anne-Laure (Maman) qui m'a motivé à continuer en post-doc au Québec. Je remercie mes professeurs Pascal Le Bourgeois et Marie-Line Mingot pour leur suivi bienveillant pendant ma thèse. Merci à mes amis toulousains Lydia, Titouan et Alexis pour leur énergie, leurs conseils, leur soutien et leur générosité.

Je remercie mes proches du fond du cœur : mes parents, mon grand-père, ma famille et amis pour m'avoir soutenu inconditionnellement dans cette aventure. Merci à Léa, mon acolyte de Licence, d'avoir assuré un soutien sans faille depuis Corvalis (USA), et Lise, mon coup de foudre amical de Master, pour toutes nos discussions, scientifiques ou non, et nos visites. Je remercie également mon ami de tout-petit Valentin, toujours prêt pour des vacances, et Bénédicte, qui me connaît si bien et a toujours été là pour moi.

Et enfin, mon dernier merci est pour Micka, qui partage ma vie. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir, me rassurer et me pousser, même dans les moments les plus difficiles. De nouvelles aventures nous attendent mais je sais depuis longtemps que je peux compter sur toi. Je t'aime tout simplement.

Sommaire

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique 5

Partie I. Bactériophages : généralités et classification des virus 7

1. Définition 7

2. Classification des virus et des phages 7

3. Organisation et évolution des génomes phagiques 9

4. Phages et écosystème : modalités d'études 12

4.1. Approche par isolement préalable 12

4.2. Approches globales sans nécessité d'isoler et de cultiver 13

5. Evolutions de la classification des phages et de leur nomenclature 14

Partie II. Cycles de vie des *Caudovirales* 18

1. Reconnaissance de l'hôte et injection de l'ADN 18

2. Le cycle lytique 21

3. Le cycle lysogénique 22

3.1. Mise en évidence de la lysogénie 23

3.2. Le choix lyse/lysogénie 24

3.3. Avantages et inconvénients liés à la lysogénie 26

4. Autres cycles 27

Partie III. Prédation des bactéries par les phages 29

1. Les phages destructeurs de levains en fermentation 29

2. Les phages acteurs du bio-contrôle 30

2.1. Applications médicales 31

2.2. Applications en agro-alimentaire et agriculture 33

Partie IV. Quelle incidence des phages pendant l'élaboration du vin ? 35

1. L'élaboration du vin et le rôle d'*Oenococcus oeni*. 35

1.1. *Oenococcus* et la fermentation malolactique des vins 35

1.2. L'espèce *Oenococcus oeni* 42

1.2.1. Diversité phénotypique 43

1.2.2. Diversité génomique 44

1.2.3. Du génotype au phénotype 46

2. Paramètres physico-chimiques du vin influençant la physiologie des micro-organismes et la FML 47

3. Les échecs de FML et le développement de levains FML 49

4. Le phage acteur de l'environnement œnologique 50
4.5. Infection phagique : une source de défauts de FML ? 61
4.6. La lysogénie chez *O. oeni* et impact sur la sélection des levains 65
4.7. Les phages peuvent-ils être des outils de bioprotection en œnologie ? 65
Matériels et méthodes 67
I. Matériel biologique et conditions de culture 69
1. Panels de souches 69
2. Conditions de culture et de conservation des bactéries 72
3. Suivi de la croissance bactérienne 72
3.1. Mesure de DO 72
3.2. Dénombrement bactérien 72
II. Isolement des phages à partir d'échantillons œnologiques 73
1. Phages infectant *O. oeni*. 73
1.1. Préparation des échantillons de vins 73
1.2. La double couche : titration d'échantillons environnementaux et de lysats phagiques 74
1.3. Repiquage des plages de lyse et purification des phages 75
1.4. Production d'un lysat phagique concentré 76
2. Phages infectant les bactéries acétiques 76
III. Obtention de clones résistants aux bactériophages 77
1. Obtention de dérivés lysogènes 77
2. Obtention de mutants résistants à des phages lytiques (BIMs) 78
IV. Etude de l'impact des polyphénols sur le développement lytique 78
V. Méthodes de caractérisation 79
1. Observation en microscopie électronique à transmission (MET) 79
1.1. Observation des bactériophages 80
1.2. Observation de cellules d'*O. oeni* 80
2. Spectre de résistance 82
3. Adsorption 82
VI. Approches moléculaires 83
1. Extraction d'ADN bactérien 83
2. Extraction d'ADN phagique 85
3. Digestion de l'ADN phagique par des enzymes de restriction et recherche d'extrémités cohésives 86
4. Approches PCR 87

5. Séquençage des génomes phagiques et outils bio-informatiques 90
Résultats 91
Chapitre I 93
Mise en évidence de bactériophages dans l'environnement œnologique 93
Avant-propos 95
Partie I. A survey of oenophages during winemaking reveals a novel group with unusual characteristics. 98
Partie II. Apports complémentaires des analyses conduites sur les millésimes 2014 et 2015 108
1. Proportion d'échantillons positifs et étapes concernées 109
2. Source des phages 110
3. L'impact du protocole sur la détection de phages actifs 112
4. Le protocole 2 enrichit la population phagique 113
5. Les apports du typage dans l'analyse des 136 phages isolés 114
5.1. Modalités et résultats du typage 114
5.2. Distribution des types de phages selon le type de vin et l'étape 115
5.3. Richesse des échantillons en phages 116
6. La dynamique des flores lors de la vinification 117
Partie III. Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting *Gluconobacter cerinus*, an acetic acid bacterium associated with winemaking 119
Conclusion du chapitre I 143
CHAPITRE II 145
Diversité génomique des oenophages 145
Partie I. Outils de typage rapide des oenophages tempérés 149
1. Le système de typage rapide des phages à Intégrase de type A 149
2. Evolution vers un schéma intégré de typage rapide des membres du super-groupe ABC .. 151
2.1. Origine des nouvelles données de séquençage analysées (2014-2017) 151
2.2. Apports des nouveaux génomes dans l'évaluation de la diversité des phages A 152
2.2.1. Un quatrième répresseur – like au sein du groupe A 152
2.2.2. De nouvelles architectures de prophages A issus de l'analyse du panel supplémentaire de souches 155
2.3. Elargissement du schéma au typage des phages B et C 155
2.3.1 Nouveaux prophages B et C identifiés 156
2.3.2. Intégration des phages B et C au schéma de typage : vers un outil applicable aux membres du super-groupe ABC 158
3. Schéma de sous typage au sein du cluster D 161

Partie II. Application des outils au typage rapide des phages du super-groupe ABC, et du cluster D issus du Millésime 2014 163
1. Sous-typage des phages du super-groupe ABC isolés au cours du millésime 2014 163
1.1. Phages A 163
1.2. Phages C isolés au cours du millésime 2014 166
1.3. Phages B isolés au cours du millésime 2014 168
2. Phages du cluster D isolés au cours du millésime 2014 168
Partie III. Caractérisation des phages unk 170
1. Morphologie 170
2. Spectre d'hôte 170
3. Le génome de unk162.1 172
4. Autres phages unk 175
Partie IV. Génomique comparative des oenophages et perspectives d'études 176
CHAPITRE III 181
Interactions entre les phages et leurs hôtes bactériens en présence de composés phénoliques 181
Partie I. Modulation du développement lytique des oenophages en présence de composés phénoliques 183
1. Optimisation des conditions expérimentales 183
2. Effet des molécules phénoliques d'intérêt sur le cycle lytique 185
2.1. Effet de la quercétine sur le phage OE33PA 185
2.2. Effet de la quercétine sur le phage unk67.1 187
2.3. Effet des autres molécules phénoliques contenues dans les fractions F9 et F11 188
3. Mécanismes d'action possibles des composés phénoliques 189
3.1. Effet d'autres molécules 189
3.2. Effet des flavonols sur l'adsorption du phage OE33PA 192
3.3. Comparaison des modalités d'adsorption des phages OE33PA et unk67.1 sur leur hôte bactérien 194
3.4. Analyse comparative des gènes phagiques responsables de l'adsorption sur la bactérie hôte 195
3.5. Observation des cellules en MET après exposition aux flavonols 198
4. Conclusions et perspectives 201
Partie II. Modification du phénotype des colonies lysogènes obtenues sur gélose au jus de raisin 204
1. Stabilité du phénotype 204
2. Le phénotype est indépendant du prophage et du site d'insertion 206

3. La modification de phénotype est indépendante de la souche utilisée pour la lysogénisation 207
4. Exploration de l'origine de la coloration des colonies rouges 207
5. Conclusion et perspectives 209
Conclusion générale 211
Références bibliographiques 217
Communications scientifiques 241
Annexes 243

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Atomic Force Microscopie

ANI : Average nucleotide identity

ARN ou RNA : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BA : Bactérie acétique

PEG : Polyethylene glycol

BET : Bromure d'éthidium

BIM : Bacteriophage insensitive mutant

BL : Bactérie lactique

CBM : Carbohydrate-binding module

CMI : concentration minimale inhibitrice

CO_2 : Dioxyde de carbone

CRB OENO : Centre de ressources biologiques œnologique

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

ddPCR : Digital Droplet PCR

DLS : Dynamic Light Scattering

DO : Densité Optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EPS : Exopolysaccharides

FA : Fermentation Alcoolique

FML : Fermentation malolactique

g : grammes

GBDP : Genome-BLAST Distance Phylogeny

h : heures

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

JR : Jus de raisin

L : litre

m : mètre

MC : Mitomycine C

MCP : Major Capsid Protein

MET : Microscopie électronique à transmission

min : minutes

MLST : Multilocus Sequence Typing

MOI : Multiplicity of infection

ORF : Open Reading Frame

pb : paire de base

PCR : Réaction en chaine par polymérase

PDC : Pied-de-cuve

qPCR PCR quantitative

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

RBP : Receptor Binding Protein

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RM : Système de restriction-modification

RSS : Recombinaison site spécifique

sec : seconde

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SO_2 : Dioxyde de soufre

TMP : Tape-length Measure Protein

UFC : Unité formant colonie

UFP : Unité Formant Plages

v/v : volume/volume

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

Liste des figures

Figure 1. Logo du projet ANR Lysoplus 3
Figure 2. Principales familles de phages infectant les bactéries (B) et virus d'Archées (A) 9
Figure 3. Définition des phages strictement lytiques (adaptée de Hobbs & Abedon, 2016). 10
Figure 4. Evolution du nombre de génomes phagiques séquencés. 15
Figure 5. Schéma de l'organisation génomique du module de morphogénèse de la queue chez les *Siphoviridae* infectant les lactocoques 20
Figure 6. Schéma des protéines de la plaque basale des prophages de *Lb. casei* 21
Figure 7. Les différents cycles de réplication des phages (Feiner *et al.*, 2015). 22
Figure 8. Intégration et excision du prophage pendant la RSS (d'après Menouni *et al.*, 2015). 23
Figure 9. Le système arbitrium (Erez *et al.*, 2017). 25
Figure 10. Carrier state (CSCL) chez *Campylobacter* (d'après Siringan *et al.*, 2014). 27
Figure 11. Classification des phages selon le mode d'infection et de relargage des nouveaux virions (Hobbs & Abedon, 2016). 28
Figure 12. Classification des composés phénoliques du vin 36
Figure 13. Structures de base des acides phénoliques et des flavonoïdes (Khoddami *et al.*, 2013) 36
Figure 14. Structure de deux stilbènes (Vian *et al.*, 2005) 36
Figure 15. Schéma simplifié du procédé de vinification en vins blancs (A) et rouges (B). 39
Figure 16. Transports de l'acide L-malique dans la cellule *de O. oeni* et rôle de la FML dans le maintien du pH interne (Bastard, 2015). 41
Figure 18. Deux mécanismes peuvent expliquer la réduction du nombre d'UFC mesurées 48
Figure 19. Sites *attB* potentiels utilisés par les prophages et différents remnants chez l'espèce *O. oeni*.. 54
Figure 20. Localisation des séquences prophagiques sur le chromosome d'*O. oeni*. d'après Jaomanjaka (2014). 55
Figure 21. Organisation type d'un prophage chez *O. oeni* (d'après Jaomanjaka, 2014) 59
Figure 22. Analyse de génomique comparative des prophages. Les séquences nucléotiques des prophages ont été comparées grâce à Jdotter.. 60
Figure 23. Préparation des échantillons pour la recherche de phages 74
Figure 24. Dispositif expérimental des tests d'infection en présence de composés phénoliques. 79
Figure 25. Exemple de FML spontanée (millésime 2014). 111
Figure 26. Exemple d'inoculation de levains FML (millésime 2014). 111
Figure 27. Amplification des phages par le protocole 2. 113
Figure 28. Dynamique des populations de BL et de phages actifs dans les vinifications en rouge menées dans le château III. 118
Figure 29. Principe du schéma de sous-typage des phages A proposé par Jaomanjaka *et al.* (2014)..... 149
Figure 30. Identification d'un quatrième type de répresseur CI-like chez les phages A.. 153
Figure 31. Nouveau schéma de sous-typage des phages A. 154
Figure 32. Alignement des 5 sous-groupes de phages int-C. 156
Figure 33. Comparaison des protéines CI_1 et CI_{1del} (clustal omega). 158
Figure 34. Schéma de typage des phages D selon Jaomanjaka (2014). 162
Figure 35. Arbre phylogénétique des phages A (méthode UPGMA) et comparaisons avec le caractère lytique 165

Figure 36. Comparaison du phage X149.2 avec le prophage S13 du cluster D (Blastn par Easyfig). ..166
Figure 37. Comparaison nucléotidique des phages lytiques X149.2 et X28.2 (Easyfig). 167
Figure 38. Comparaison nucléotidique des trois phages B libres (Easyfig).....168
Figure 39. Observation des phages unk162.1 (A) et unk67.1 (B) en MET.....170
Figure 40. Organisation du génome du phage unk162.1. 173
Figure 41. Comparaison des phages unk162.1 et unk27.1a 175
Figure 42. Relations phylogénétiques entre les oenophages. 177
Figure 43. Arbre phylogénétique Tetra réalisé avec MEGA7 par la méthode de Neighbor-Joining. ..178
Figure 44. Arbre phylogénétique des protéines TMP des oenophages (NJ, MEGA7). 179
Figure 45. Détermination de la CMI par suivi de DO_{600nm}. 184
Figure 46. Stabilité des phages en présence de polyphénols. 185
Figure 47. Schéma de réalisation des essais et indicateurs suivis. 185
Figure 48. Effet de la quercétine sur le cycle lytique de OE33PA (n=3). 186
Figure 49. Impact de la MOI sur l'effet de la quercétine. 186
Figure 50. Effet de la quercétine sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1 à une MOI de 0,03. 188
Figure 51. Effet du resvératrol sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1. 189
Figure 52. Structure des acides phénoliques (A), des flavonols (B) et de la flavone testés (C). 190
Figure 53. Effet de la morine sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1. 191
Figure 54. Adsorption du phage OE33PA sur la souche IOEB S277 en présence de flavonols (morine ou quercétine à 50 µg/ml). 193
Figure 55. Courbes d'évolution des populations résistantes en fin de lyse lors de l'infection de *O. oeni* IOEB S277 en présence de OE33PA ou de unk162.1.....195
Figure 56. Observation d'*O. oeni* IOEB S277 en MET après exposition aux flavonols. 199
Figure 57. Observation de *S. aureus* en MET après exposition à la quercétine (Hirai *et al.*, 2010) 199
Figure 58. Observation d'*O. oeni* en MET après marquage des polysaccharides. 200
Figure 59. Différents morphotypes de colonies (rouge/blanc) observés à partir d'un mélange 1/1 des souches IOEB S277 et IOEB S277 (Aciné). 205
Figure 60. Mélange de bactéries lysogènes (rouges) et non lysogènes (blanches) dénombré sur milieu gélosé JR non autoclavé (à gauche) et autoclavé (à droite). 208
Figure 61. Aspects des colonies issues de mélanges de souches lysogène/non lysogène en présence de JR rouge et de JR blanc additionné d'extraits T+A (tanins + anthocyanes). 208
Figure 62. Aspects des colonies issues de mélanges de souches lysogène/non lysogène en présence des extraits T+A en milieu JR blanc. 209

Liste des Tableaux

Tableau I. Exemples de récepteurs pariétaux identifiés chez les phages infectant les bactéries à Gram positif, d'après Bertozzi Silva *et al.* (2016) 19
Tableau II. Quelques exemples de phages de bactéries lactiques récemment isolés et caractérisés. . 30
Tableau IV. Liste de composés phénoliques quantifiés par HPLC dans un vin rouge italien (mg/L) 37
Tableau V. Facteurs inflençant la FML (adapté de Betteridge *et al.,* 2015) 47
Tableau VII. Critères de sélections de levains FML (d'après Torriani *et al.*, 2011) 49
Tableau VIII. Echantillons oenologiques contenant des bactériophages libres 51
Tableau IX. Lysogénie chez *O. oeni* et modalités d'induction des souches 52
Tableau X. Observations en MET des phages isolés à partir de l'environnement œnologique 57
Tableau XI Autres caractéristiques des oenophages 58
Tableau XII. Evaluation de la diversité et classification 59
Tableau XIII. Liste des souches d'*O.oeni* utilisées dans cette étude 69
Tableau XIV. Souches d'*O.oeni* inclues dans l'étude de génomique comparative 70
Tableau XV. Liste des souches de BL utilisées 71
Tableau XVI. Liste des souches de BA utilisées dans cette étude 71
Tableau XVII. Composés phénoliques testés 78
Tableau XVIII. Liste des amorces utilisées 87
Tableau XIX. Liste des amorces utilisées pour le typage des oenophages 88
Tableau XX. Echantillonnage du millésime 2015 108
Tableau XXII. Niveaux de populations en phages associés aux échantillons du millésime 2015 109
Tableau XXIII. Comparaison des efficacités des deux protocoles sur les deux millésimes 2014 et 2015 112
Tableau XXIV. Distribution des types de phages dans les échantillons selon le protocole utilisé 114
Tableau XXV. Distribution des différents types de phages selon le type de vin 116
Tableau XXVI. Echantillons positifs contenant plusieurs types de phages 117
..... 150
Tableau XXVIII. Sous-typage des phages portant une intégrase de type A (Jaomanjaka, 2014) 150
Tableau XXIX. Les prophages A exprimant les répresseurs-like CI (1, 2 ou 4) font partie de groupes immuns distincts 154
Tableau XXX. Diversité des phages et prophages A 155
Tableau XXXI. Origine des souches porteuses des prophages C 157
Tableau XXXII. Sous-typage simplifié des phages du super-groupe ABC 160
Tableau XXXIII. Deux combinaisons des gènes choisis sont retrouvées chez les phages D. 161
Tableau XXXIV. Analyse *in silico* de l'ensemble des prophages du cluster D 162
Tableau XXXV. Sous-typage des phages A isolés du millésime 2014 163
Tableau XXXVI. Sous-types de phages A représentés dans les échantillons du millésime 2014 164
Tableau XXXVII. Sous-typage des phages D isolés. 168
Tableau XXXVIII. Spectre d'hôte du phage unk162.1 sur 24 souches d'*O. oeni* 171
Tableau XXXIX. Mise en évidence de l'efficacité du système RM de la souche IOEB 0608 vis-à-vis du phage unk162.1 172
Tableau XL. Spectre d'hôte du phage unk162.1 sur des souches de différentes espèces de BL. 172
Tableau XLI. Comparaison des caractéristiques des génomes des oenophages 172
Tableau XLII. Génome du phage unk162.1 173

Tableau XLIII. Effets observés dans le développement lytique en présence de composés phénoliques 190
Tableau XLIV. Sensibilité des BIMs aux phages de challenge 195
Tableau XLV. Annotation des ORFS associés à la reconnaissance de l'hôte 196
Tableau XLVI. Sensibilité d'oenophages aux BIMs 198
Tableau XLVII. Epaisseur de la paroi après traitement aux polyphénols 200
Tableau XLVIII. Dénombrement de colonies issues des mélanges de souches IOEB S277 lysogène/non lysogènes S277 sur gélose JR et distributions relatives des colonies rouges et blanches 205
Tableau XLIX. Pourcentage de colonies blanches et rouges dénombrées à partir d'un mélange 1/1 de lysogène/non lysogène de la souche IOEB S277. 206
Tableau L. Pourcentage de chaque morphotype de colonies (rouge/blanc) dénombré à partir du mélange 1/1 de souches S25 lysogène/non lysogènes. 207

Introduction générale

Les bactériophages sont des prédacteurs de bactéries et sont particulièrement redoutés dans la production d'aliments fermentés. En détruisant les levains, ils sont la source d'accidents de fermentation qui impactent la qualité finale du produit. Ceci est particulièrement le cas dans les fermentations laitières qui sont assurées par les bactéries lactiques (BL). Le risque d'attaque phagique y est fréquent et les efforts d'isolement et de caractérisation des phages infectant *S. thermophilus* et *Lc. lactis* sont au cœur des préoccupations des fournisseurs de levains. Les études visent à améliorer les connaissances sur la biologie des phages de BL et d'identifier leurs réservoirs dans l'objectif de mettre au point des approches d'hygiène adaptées et de sélectionner des souches commerciales disposant de mécanismes naturels de résistance. D'autres BL sont également utilisées pour la production d'autres aliments fermentés. C'est le cas des BL de la famille des *Leuconostocaceae,* qui sont associées aux levains de panification, à la fermentation malo-lactique des vins et à l'aromatisation de certains fromages. Dans ces différents types d'aliments, la présence de phages dans l'écosystème est peu documentée, de même que l'incidence des interactions phage-bactérie sur la qualité finale des produits. Ces aspects ont fait l'objet d'un projet de recherche appelé Lysoplus, financé par l'ANR (**Figure 1**). Cette thèse a porté sur l'écosystème œnologique, dans lequel les phages actifs sur la BL *Oenococcus oeni (O. oeni)* responsable de la fermentation malolactique (FML) des vins restent méconnus.

Figure 1. Logo du projet ANR Lysoplus

Dans le processus de transformation du moût en vin, l'étape de la FML s'avère souvent capricieuse. Afin de mieux la maîtriser, les professionnels peuvent inoculer des levains commerciaux, composés majoritairement de souches d'*O. oeni* sélectionnées. Cependant, le recours aux souches commerciales ne garantit pas toujours le succès de la FML. Les raisons de l'échec de FML sont le plus souvent attribuées aux conditions physico-chimiques difficiles du milieu expliquant le manque de biomasse et les retards ou échecs de FML. La présence de phages pourrait également expliquer les fluctuations qualitatives et/ou quantitatives de la population de *O. oeni* dans le vin. L'existence de phages infectant *O.oeni*, appelés oenophages est connue dans le vin (Jaomanjaka *et al.*, 2013; Poblet-

Icart *et al.*, 1998), et une forte fréquence de la lysogénie chez *O. oeni* a été rapportée. Une première étude de caractérisation des oenophages a montré qu'ils étaient tempérés et un premier schéma de classification de leur génome a été proposé. L'objectif de ce travail de thèse était de poursuivre l'analyse de la diversité des oenophages à partir de l'environnement et de comprendre l'impact de la composition du vin sur les relations phage-hôte. Dans cette thèse,

- des inventaires de phages actifs ont été réalisés pendant les millésimes 2014 et 2015 ;
- une étude de génomique comparative est développée, et la classification des oenophages est ainsi revue ;
- l'impact des composés phénoliques du vin sur les interactions entre les phages et leur hôte bactérien a été évalué.

Synthèse bibliographique

Partie I. Bactériophages : généralités et classification des virus

1. Définition

Les bactériophages (ou phages) sont définis comme étant des virus spécifiques de bactéries. Aujourd'hui, le terme englobe plus généralement les virus infectant les Eubactéries et les Archées (Clokie *et al.*, 2011). Leur découverte est attribuée à Félix d'Hérelle en 1917, même si ce dernier s'est inspiré de travaux antérieurs menés par Frederick Twort en 1915 (Duckworth, 1976). Comme établi dans les premières définitions, il s'agit d'entités filtrables. Les premières observations en microscopie électronique à transmission (MET) datent des années 1940 et ont permis de mettre en évidence des particules dont la taille est de l'ordre du nanomètre. Les phages comportent un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), simple ou double brin, à l'intérieur d'une structure protéique, ou lipoprotéique, appelée capside. Ils sont incapables de se multiplier par scission binaire et dépendent de la machinerie énergétique et traductionnelle de leur hôte. Leur multiplication se fait donc par auto-assemblage de leurs constituants. Ces caractéristiques en font des parasites intracellulaires obligatoires.

Estimés à une quantité de 10^{31} (Wommack & Colwell, 2000, Breitbart & Rohwer, 2005), les bactériophages sont les organismes biologiques les plus abondants de la biosphère. Ils sont ubiquitaires et sont partout où se trouvent leurs hôtes potentiels. Les concentrations sont estimées à 1 million dans une goutte d'eau de mer, 100 millions dans 1 g de sol ou dans 1 g de fèces humain (Hayes *et al.*, 2017).

2. Classification des virus et des phages

Il existe une vaste diversité de virus et ces derniers infectent des hôtes variés : algues, moisissures, protozoaires, bactéries, Archées, invertébrés, plantes, vertébrés. La classification faisant aujourd'hui autorité en la matière est proposée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Elle reprend certains critères d'une classification plus ancienne, dite de Baltimore, basée sur le type d'acide nucléique des virus (ADN ou ARN), et son mode d'expression. Outre la composition du génome, la morphologie est l'autre critère majeur de classification (au rang de la famille). Les propriétés physico-chimiques sont également évaluées (70 propriétés sont utilisables) (Ackermann, 2011).

Les virus sont classés en ordre (-*virales*), famille (-*viridae*), genre (groupe, -*virus)* et espèce type. Dans son 10ème rapport (ICTV, 2017), l'ICTV reconnaît un ensemble de 125 familles qui se répartissent dans les 8 ordres suivant: *Bunyavirales, Caudovirales, Herpesvirales, Ligamenvirales, Mononegavirales, Nidovirales, Picornavirales* et *Tymovirales*. Les virus ne répondant pas aux critères établis sont provisoirement placés dans un 9ème ordre dit des « non assignés».

Les virus infectant les bactéries et les Archées décrits à ce jour sont réunis en familles au sein des ordres des *Caudovirales* (phages à queue, ou caudés) et **des *Ligamenvirales***. Quelques familles ne correspondent pas aux critères définis pour ces deux ordres (**Figure 2**). Les morphologies des particules sont très diverses. Les virus des Archées forment des groupes spécifiques et distincts, de par leur morphotype, et également de par leur génome, et la nature des protéines codées (Prangishvili *et al.*, 2006; Prangishvili, 2013). Il est intéressant de noter que parmi les phages observés à ce jour en MET, une large majorité (96%) sont caudés (Borysowski, 2014). Dans l'ordre des *Caudovirales*, les *Siphoviridae* ont été notamment très abondamment décrits dans la littérature. En 2016, les phages caudés s'organisent en six sous-familles, 80 genres, et 441 espèces (Krupovic *et al.*, 2016).

Les phages les plus imposants en taille sont dits « géants » ou « Jumbo ». Il s'agit de phages caudés, dont une centaine de représentants ont été isolés à partir d'environnements divers (eau, sols, sédiments marins, tissus végétaux, composts, fécès d'animaux …). La grande majorité de ces études ont été réalisées sur les quatre dernières années (Yuan & Gao, 2017) et le traitement initial des échantillons par filtration serait l'une des causes de leur découverte tardive. Le Jumbo phage le plus grand est le phage G infectant *Bacillus megaterium*, dont la capside a une taille de 160 nm, et la queue mesure 453 nm. Les phages Jumbo présentent des génomes de taille supérieure à 200 kb (Hendrix, 2009). Pour le phage G, la taille de son génome est de 497 kb, soient 87 kb de moins que le génome de la plus petite cellule bactérienne, *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al.*, 1995, Yuan & Gao, 2017). A l'opposé, les phages les plus petits sont associés à la famille des *Microviridae*. On y trouve le phage phiX174, dont la taille et la simplicité du génome (5386 bp), en ont fait le premier génome séquencé, à l'origine de la technique de séquençage « selon la méthode de Sanger » (Sanger *et al.*, 1977).

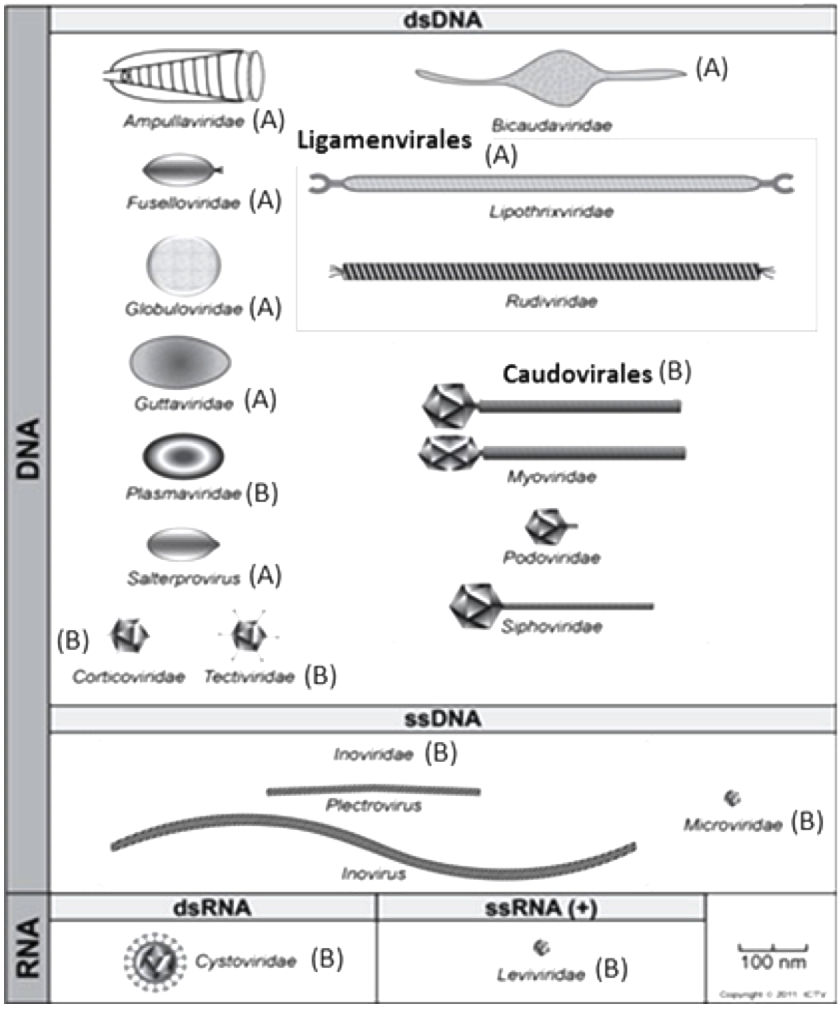


Figure 2. Principales familles de phages infectant les bactéries (B) et virus d'Archées (A) (schéma adapté de la source https://talk.ictvonline.org/taxonomy*).* Les familles *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae* appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Les familles *Lipothrixviridae* et *Rudiviridae* appartiennent à l'ordre des *Ligamenvirales*. Les autres familles ne sont pas affiliées à un ordre donné.

3. Organisation et évolution des génomes phagiques

Le génome phagique est organisé en modules fonctionnels, c'est-à-dire en unités génétiques et fonctionnelles indépendantes (Simon *et al.*, 1971). Cette notion 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 lytiques d'*E. coli*, les mycobactériophages ou encore les phages des BL *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* (Ford *et al.*, 1998; Lucchini *et al.*, 1999). Une dizaine de modules se distinguent principalement (Brüssow & Desiere, 2001; Desiere *et al.*, 2002), regroupant les gènes impliqués dans l'empaquetage de l'ADN, la morphogénèse de la tête, l'assemblage de la tête et de la queue, les fibres caudales, la lyse bactérienne, la conversion lysogénique, la commutation cycle

lytique-lysogénique, la réplication de l'acide nucléique, et la régulation de la transcription. Les phages jumbo ont dans leur génome des gènes codant des polymérases (ADN et ARN) ainsi que de nombreux gènes tRNA. Ces fonctions supplémentaires pourraient se substituer aux fonctions de l'hôte essentielles au cycle de vie des phages à plus petits génomes, et réduire la dépendance des phages Jumbo vis-à-vis de leur hôte (Ceyssens *et al.*, 2014; Yuan & Gao, 2017).

L'ordre des modules sur la carte génomique des phages infectant les bactéries d'une même espèce est relativement conservé. Les différents « allèles » des modules sont souvent librement assortis, générant une diversité génétique importante des phages (Brüssow *et al.*, 2004). Ainsi, l'architecture des génomes des phages est décrite comme « mosaïque » (Hatfull & Hendrix, 2011).

Les populations de phages virulents et de phages tempérés ont des structures génétiques différentes (Chopin *et al.*, 2001). Alors que les phages tempérés (et les phages ex-tempérés qui en dérivent) présentent une structure en « quasi-espèce », les phages virulents ont au contraire des génomes distants (**Figure 3**).

Hobbs et Abedon (2016) définissent la catégorie des phages professionnellement lytiques et introduisent la notion de distance génétique avec l'ancêtre tempéré (**Figure 3)**. Ainsi, les phages virulents sont des ex-tempérés proches génétiquement. La terminologie qualifiant les phages de « professionellement lytiques » est proposée pour les phages les plus distants.

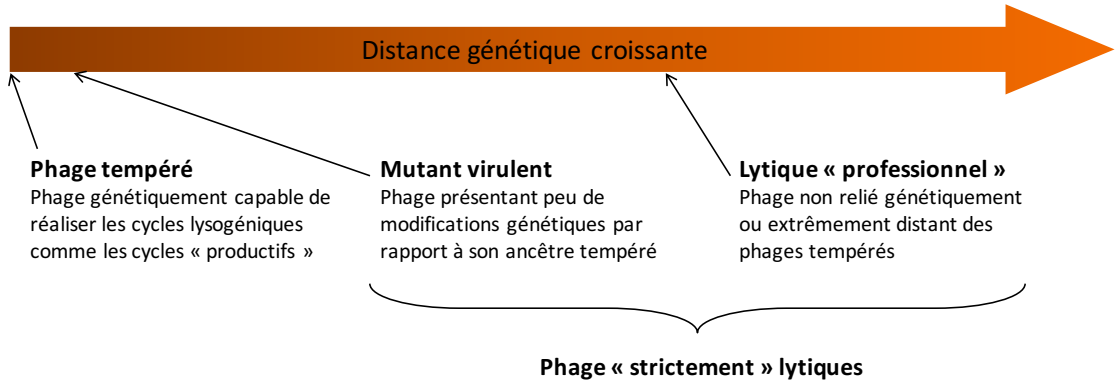


Figure 3. Définition des phages strictement lytiques (adaptée de Hobbs & Abedon, 2016).

Les échanges génétiques entre phages ont lieu lorsque deux phages différents sont présents dans une même cellule bactérienne (co-infection ou infection d'une cellule lysogène). Ils résultent de mécanismes moléculaires de recombinaison homologue ou de recombinaison illégitime. On ignore l'importance relative de ces différents types de recombinaisons dans l'évolution des phages (Hatfull *et al.*, 2008; Hendrix, 2002; Hendrix *et al.*, 2000).

La recombinaison illégitime intervient au niveau de sites aléatoires entre les différents phages, mais est le plus souvent située au niveau des ORFs (Open Reading Frame). Le phage recombinant est souvent non fonctionnel. Seul un petit nombre d'événements de recombinaison aboutissent à des phages viables (Hatfull *et al.*, 2008; Hendrix, 2002). **La recombinaison homologue** est soutenue par la présence de séquences conservées entre les modules des phages. Les enzymes impliquées dans la recombinaison homologue sont d'origine bactérienne (RecA), ou codées par le phage (Brüssow *et al.*, 2004).

Mavrich et Hatfull (2017) montrent que grâce au transfert horizontal de gènes, les bactériophages évoluent selon deux modes principaux, qui diffèrent selon l'importance du flux de gènes. Les phages tempérés présentent aussi bien des flux de gènes faibles ou importants, alors que les phages lytiques ne montrent qu'un flux de gènes faible. Cependant, le mode d'évolution dépend également du phylum de l'hôte, ainsi que la constitution génétique propre des phages. Enfin, il n'existe pas de caractéristique génétique permettant de distinguer les phages partageant le même mode d'évolution. Selon les auteurs, les taux de transfert horizontaux entre les deux modes ne sont pas non plus corrélés à la présence de gènes particuliers.

L'avenir à long terme du prophage dans le chromosome bactérien est le plus souvent éphémère (Brüssow *et al.*, 2004). L'analyse *in silico* des génomes bactériens montre un grand nombre de reliquats de prophages non fonctionnels par des phénomènes de délétion de fragments d'ADN, ou de mutations. Les prophages peuvent également faire l'acquisition de gènes « morons » par transduction (Brüssow *et al.,* 2004). Il s'agit de gènes non impliqués dans le cycle de vie du phage mais qui influencent ses capacités d'adaptation. Les morons sont acquis par le phage lors de l'excision à partir du génome bactérien (excision imparfaite). La génomique comparative des phages montre que ces gènes sont localisés près du site d'attachement phagique *attP* et du module de lyse, et présentent un pourcentage de GC indiquant une origine bactérienne. Les morons sont transcriptionnellement autonomes et indépendants des gènes impliqués dans la lysogénie et le cycle lytique (Juhala *et al.*, 2000).

4. Phages et écosystème : modalités d'études

4.1. Approche par isolement préalable

Isolement

La méthode traditionnelle d'étude des bactériophages met en œuvre une étape d'isolement, par la technique de la double couche (Adams, 1959). Elle permet de quantifier et de caractériser les phages infectant un hôte spécifique. L'hôte peut être isolé de l'environnement d'intérêt, ou être une souche modèle sensible aux phages.

Il existe cependant plusieurs limites à cette approche. Les phages isolés infectant des souches préalablement sélectionnées, il est difficile d'estimer la réelle proportion de phages d'un échantillon. En effet, certains phages présents peuvent ne pas infecter les souches testées, par absence des récepteurs ou par sensibilité aux éventuels mécanismes de résistance bactériens.

Les phages isolés sont capables de se propager sur la souche choisie, mais ne sont pas nécessairement représentatifs des phages les plus abondants dans la population « naturelle » de l'échantillon environnemental. Il est donc intéressant de coupler cette approche traditionnelle avec d'autres approches complémentaires.

La caractérisation préliminaire des particules

Microscopie électronique. La première observation des bactériophages en microscopie électronique (MET) date de 1940 par H. Ruska en Allemagne (Ackermann, 2011) et a permis de décrire la morphologie des phages. La première évolution majeure est la technique de la coloration négative, puis vient le développement de la microscopie cryoélectronique suivie de la reconstruction tri-dimensionnelle des images. Grâce à la MET, il est montré que la capside des phages caudés a une origine monophylétique et qu'il existe des liens structuraux entre certains bactériophages de bactéries et d'Archeae et des virus de vertébrés (Ackermann, 2011).

La DLS (Dynamic Light Scattering) peut permettre de déterminer la taille et la forme des particules virales en solution (Nikiforov *et al.*, 2016), ainsi que leur concentration (Makra *et al.*, 2015). Elle peut aussi être utilisée dans l'étude des phages, notamment le mécanisme d'éjection de l'ADN, comme cela a été fait chez le phage lambda par Löf *et al.* (2007).

Le développement de nouveaux outils tels que la **microscopie à force atomique** (AFM) permet d'étudier finement les interactions phage-hôtes. Ainsi Zago *et al.* (2012) ont pu visualiser les modifications à la surface des cellules de *Lactobacillus helveticus* aux différentes étapes de l'infection. Cela leur a permis de poser des hypothèses sur les éléments structuraux et moléculaires impliqués dans l'adsorption et de différencier une cellule infectée d'une cellule intacte. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires d'interaction entre l'endolysine et le peptidoglycane ont été également décrits par AFM chez *Staphylococcus aureus* (Liu *et al.*, 2017).

Séquençage des particules

Le nombre de génomes phagiques disponibles sur les bases de données a dépassé la valeur de 25000 au 1er janvier 2017 (Adriaenssens & Brister, 2017). Les génomes de phages sont généralement séquencés grâce à la technologie Illumina (MiSeq), en utilisant les librairies NexteraXT (Illumina). Une couverture de 30X a été déterminée comme nécessaire pour obtenir un assemblage satisfaisant (Rihtman *et al.,* 2016). L'assemblage des génomes phagiques peut être réalisé grâce aux outils Newbler, SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), Velvet (Zerbino & Birney, 2008) ou encore Ray (Boisvert *et al.,* 2010). L'outil DNAmaster (http://phagesdb.org/DNAMaster/) a été développé pour annoter et explorer spécifiquement les génomes de phages. La diversité des génomes viraux est grande, et les fonctions associées à de nombreux gènes restent inconnues ou « hypothétiques ». Une banque pVOG (à l'instar des COG) a été construite et est utile à la prédiction et à l'annotation des gènes (Grazziotin *et al.*, 2017). Le phage P2 de *Lactococcus lactis* est un des phages virulents modèles les plus étudiés. Pourtant, presque la moitié de ses gènes n'ont pas de fonctions assignées. Lemay *et al.* (2017) ont récemment proposé d'utiliser le système CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* chez un hôte hétérologue, *L. lactis* MG1363, pour modifier le génome du phage P2. L'outil a permis de modifier le phage pour générer des mutations précises et étudier *in vivo* les fonctions des gènes impliqués dans le cycle lytique.

4.2. Approches globales sans nécessité d'isoler et de cultiver

La multiplication des données de séquences des phages au sein de certaines espèces a permis de mettre au point des méthodes globales. Ainsi des approches par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ou par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont été développées (Cortés *et al.*, 2015; Czajkowski *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2011; Zago *et al.*, 2015; Maszewska *et al.*, 2016).

Il n'existe aucun gène marqueur universel chez les phages tel que le gène de l'ARNr 16S utilisé pour la phylogénie des bactéries. Néanmoins chez certaines espèces, quelques marqueurs spécifiques comme les gènes codant les protéines impliquées dans l'empaquetage (TMP, terminase, protéine portale) contribuent à l'étude de la diversité des phages océaniques par PCR (Sullivan *et al.,* 2008). De tels marqueurs permettent également de quantifier directement les phages dans différents environnements naturels ou encore dans des aliments par PCR quantitative (qPCR) (Muhammed *et al.*, 2017a) ou encore d'estimer l'efficacité de techniques virucides (Ho *et al.*, 2016). Ils offrent ainsi la possibilité de s'affranchir de l'étape d'isolement et de ses limites.

Le recours à ces approches est parfois lié à la difficulté de mise en œuvre de la méthode de la double-couche. Zago *et al.* (2012) notent la difficulté à visualiser les plages de lyse des phages infectant *Lactobacillus helveticus*. Dans ce contexte, la microscopie à épifluorescence est utilisée comme alternative au dénombrement des particules virales. Le marquage au SYBR green permettrait d'obtenir une sensibilité 10 fois plus importante qu'avec la double-couche, avec une limite de détection de 10^6 phages/ml (Zago *et al.*, 2012). Cette méthode est donc suffisamment fiable pour permettre le suivi de la cinétique d'infection par exemple.

Depuis une quinzaine d'années, les stratégies d'étude de la diversité et du rôle des phages s'appuient sur la métagénomique virale. Leur nombre est rapidement passé de 11 en 2002 à 10 000 en 2017 (Hayes *et al.*, 2017). Les approches sont appliquées aux océans, aux compartiments du corps humain et aux aliments fermentés (Ly *et al.*, 2016, Baker *et al.*, 2017, Stefanaki *et al.*, 2017, Mirzaei & Maurice, 2017, Muhammed *et al.*, 2017b). La métagénomique peut être utilisée pour identifier les phages ou les gènes phagiques, leur abondance, ou observer la spécificité des phages dans certains écosystèmes (Cortés *et al.*, 2015, Hayes *et al.*, 2017). On observe une évolution rapide des techniques à chaque étape du protocole : purification des virus, extraction d'ADN, séquençage à haut débit, puis exploitation des données grâce à de nouveaux outils spécifiques (Castro-Mejía *et al.*, 2015; Kleiner *et al.*, 2015).

5. Evolutions de la classification des phages et de leur nomenclature

Depuis quelques années, on observe une réelle explosion du nombre de phages caractérisés. Le phénomène est lié à la multiplication des études visent à (i) réaliser des inventaires des phages infectant une même espèce ou groupe de bactéries (souvent dans le but de mettre au point une stratégie de contrôle de flores indésirables), ou bien (ii) décrire des environnements originaux et comprendre le fonctionnement global de l'écosystème concerné. Classiquement, l'analyse inclut la

caractérisation des particules (MET), une analyse du cycle de vie (durée du cycle, burst size ...) ainsi que la détermination de la séquence du génome. Ceci est rendu possible grâce à l'essor et la réduction des coûts de séquençage, ainsi qu'au développement d'outils d'analyse des données générées (assemblage, annotation, identification des extrémités …). L'intégration des données issues des comparaisons des séquences protéiques (Blastp) et de la structure génomique complète la caractérisation des phages (De Smet *et al.*, 2017). Depuis une dizaine d'années, deux autres sources apportent une quantité non négligeable de séquences : il s'agit des données de séquences de prophages, issues des données des génomes bactériens et enfin les données issues des approches de métagénomique (virus « non cultivables »). Malgré les dépôts des séquences en banque, l'existence et les caractéristiques du virion (par exemple par observation en MET) ne sont pas ou ne peuvent pas être renseignées. Il peut s'agir de phages défectifs/impossibles à cultiver. Or l'ICTV classe des virions, et non des gènes ou des protéines. Simmonds *et al.* (2017) ont récemment discuté de la nécessité d'intégrer les virus connus uniquement par approche métagénomique dans la classification officielle de l'ICTV. Comme évoqué précedemment, le nombre de génomes phagiques dans les banques de données dépasse la valeur de 25 000 (Adriaenssens & Brister, 2017), et il est à noter que la contribution des *Caudovirales* est en nette progression (**Figure 4**). Selon Bolduc *et al.* (2017), sur les 4 400 génomes de virus déposés en 2015 au National Center for Biotechnology Information (NCBI, RefSeq), seuls 43% avaient été classés par l'ICTV.

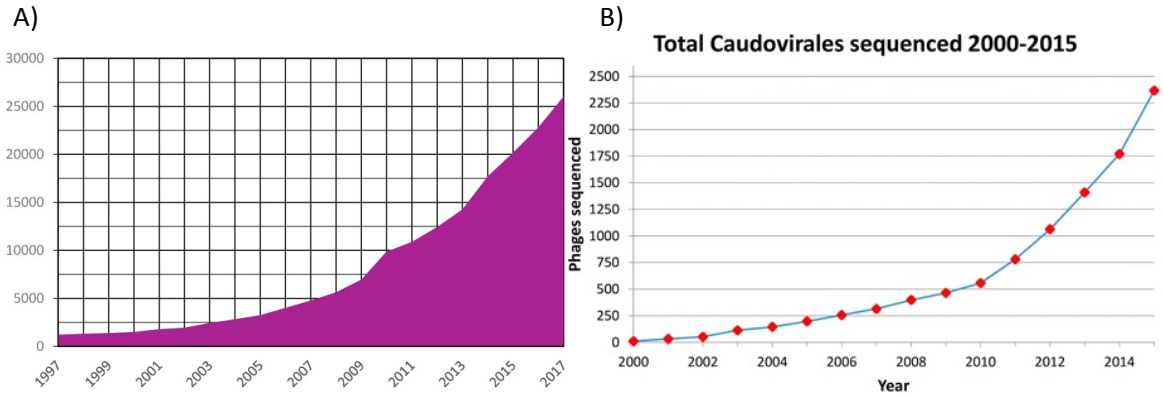


Figure 4. Evolution du nombre de génomes phagiques séquencés. A) Nombre de séquences nucléotidiques de bactériophages déposées dans les banques de données (Nucleotide Sequence Database Consortium, INSDC). Les données ont été obtenues en interrogeant GenBank (entrée nucleotide) avec les mots clés "vhost bacteria[filter]". Le graphe présente le nombre de séquences disponibles chaque 1er Janvier des années indiquées (Adriaenssens *et al.*, 2017); B) Evolution des séquences de génomes de *Caudovirales* entre 2000 et 2015 (Merrill *et al.*, 2016).

Tous ces éléments ont progressivement amené les chercheurs à critiquer et dépasser le cadre classique de la classification ICTV, qui négligeait les informations d'ordre génomique et protéique (Nelson, 2004). La stratégie semblait ardue, les phages ne possédant pas de séquences conservées comme le gène 16S chez les eubactéries. A partir de 2002, trois groupes de chercheurs ont proposé

des nouveaux systèmes de taxonomie. Rohwer et Edwards (2002) ont proposé le premier arbre protéomique des phages. La méthode analysait le protéome déduit des génomes pour un phage donné grâce aux programmes BLASTp et PROTDIST, et les résultats étaient transformés en une matrice de distance. Un consensus entre l'arbre et les genres décrits par l'ICTV a été observé. Le groupe de Roger Hendrix à L'institut des Bactériophages de Pittsburgh a quant à lui reproché le fait d'utiliser un système taxonomique hiérarchique strict, étant donné le mosaïcisme des génomes viraux, du aux transferts horizontaux entre phages (Lawrence *et al.*, 2002). Ces auteurs défendaient une approche de taxonomie Linnéenne où les virus seraient divisés en "domaines" selon le type de génome, avec une ségrégation supplémentaire entre les phages caudés et filamenteux. Enfin, un troisième schéma de classification a été proposé par Proux *et al.* (2002) au travers de la comparaison de phages infectant les bactéries lactiques. La méthode se propose de procéder à des comparaisons nucléotidiques et protéiques des modules « structuraux » des phages, considérés comme étant les modules les plus anciens et conservés parmi les phages d'origine laitière. En appliquant ces critères, les auteurs ont pu classer les phages de lactocoques en 5 genres distincts. L'approche a ensuite permis de classer les phages au sein de différents taxons. Ainsi, le gène codant la Tape-Measure Protein (TMP) a été utilisé avec succès pour distinguer les clusters au sein des mycobactériophages, l'analyse donnant des clusters distincts pour les *Siphoviridae* et les *Myoviridae* (Smith *et al.*, 2013). Cependant, elle ne s'applique pas aux *Podoviridae* qui n'ont pas de TMP. Des approches de regroupements par comparaison des identités entre génomes complets ont été également appliquées aux phages. Deux phages dont les génomes viraux partagent plus de 95% d'identité nucléotidique (ANI) appartiennent à une même espèce. Chez les Entérobactéries, la méthode a été appliquée avec succès aux phages caudés, et l'organisation en clusters a été confirmée par la phylogénie basée sur la protéine majeure de capside (MCP) (Grose & Casjens, 2014).

D'autres approches ont vu le jour, et ne sont pas forcément compatibles avec les règles érigées par l'ICTV. **La classification dite kmer-grouping** proposée par Teeling *et al.* (2004) a été appliquée aux phages par Pride *et al.* (2006). Elle permet de comparer les phages selon les fréquences de tétranucléotides (tetra) dans leur génome. L'approche donne des informations intéressantes sans devoir passer par l'annotation et est adaptée à l'étude de panels importants de phages. Un ensemble de 83 phages a été analysé et la phylogénie par approche tétra a montré que les phages infectant les Enterobactéries et les bactéries à gram négative non-Entérobactéries sont regroupés en deux clusters distincts. Il en est de même pour les phages affiliés aux cocci à gram-positive (*Staphyloccus*, *Streptococcus*, et *Lactococcus)* regroupés en un même cluster. *A contrario,* les phages infectant les espèces affiliées aux genres *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, et *Streptomyces* sont rassemblés dans des clusters différents. Par ailleurs les auteurs ont montré que le regroupement n'est pas

associé au caractère de morphologie de la queue du virion. L'approche tetra a également été appliquée à un panel de 663 mycobactériophages (Siranosian *et al.*, 2015). Il est à noter que l'approche peut également distinguer les phages infectant une même espèce, selon leur mode d'interaction avec l'hôte (lytique ou tempéré) (Deschavanne *et al.*, 2010). La différence s'expliquerait par le fait que les phages lytiques passeraient peu de temps dans l'hôte (juste le temps de la reproduction) alors que les phages tempérés resteraient associés à l'hôte plus longtemps, et y seraient exposés à des phages surinfectants ou des éléments mobiles. Dans le premier cas le phage sera restreint à des relations virus-hôte alors que dans le second, des échanges de gènes entre virus seraient plus fréquents. Enfin, l'approche montre des proximités des valeurs calculées entre le phage et son hôte et renseigne sur la co-évolution entre phages et bactéries. Elle peut permettre de déterminer les hôtes de phages orphelins (Villarroel *et al.*, 2016), mais son efficacité semble inférieure à d'autres approches (analyses des locci CRISPR, single cell sequencing…) (Edwards *et al.,* 2016).

D'autres approches de classification des phages ont utilisé des **gènes signatures.** Ainsi Asare *et al.* (2015) ont montré que les gènes codant une thymidylate synthase et une dihydrofolate réductase étaient des séquences signatures d'un nouveau groupe de phages nommé Bastille, au sein de la sous-famille *Spounavirinae*.

Plus récemment, une nouvelle approche *in silico* a été développée spécifiquement pour classer et étudier la phylogénie des phages. L'outil en ligne VICTOR (https://victor.dsmz.de) a ainsi été créé (Meier-Kolthoff & Göker, 2017). Les paramètres de la méthode de Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) ont été optimisés pour analyser les séquences nucléotidiques ou protéiques des phages, et construire un arbre phylogénétique. Un ensemble de 4 419 génomes de phage a été récupéré des bases de données publiques. Les résultats générés se sont révélés en accord avec la classification actuelle de l'ICTV, excepté au niveau de la famille des phages, pour lequel cet outil peut s'avérer offrir une résolution assez basse.

Des évolutions de la nomenclature ont été également proposées (Adriaenssens & Brister, 2017; Kropinski *et al.*, 2009). Parmi les préconisations, il est proposé de supprimer le sigle Φ devant le nom du phage. Kropinsky *et al.* (2009) proposent d'utiliser la construction suivante : vB (pour virus d'Eubactéries) puis les initiales du genre et de l'espèce infectée, puis le nom commun du phage.

Partie II. Cycles de vie des *Caudovirales*

Les phages peuvent persister dans l'environnement selon différents cycles de vie. Dans cette étude, nous décrirons les cycles des phages appartenant à l'ordre des *Caudovirales.*

1. Reconnaissance de l'hôte et injection de l'ADN

La première étape de l'infection est l'adsorption des particules virales sur leur hôte. Ceci implique des interactions entre des protéines d'adhésion du phage et des récepteurs situés sur la surface de la cellule hôte. Le virus reconnait ainsi un hôte potentiellement sensible et peut se positionner pour injecter son ADN dans la cellule. Cette étape d'adsorption est cruciale pour le processus d'infection, et va conditionner la spécificité de spectre d'hôte d'un phage.

L'adsorption est classiquement constituée de 3 étapes : le contact initial, l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible. La première étape implique des rencontres aléatoires entre le phage et son hôte, par le mouvement Brownien ou un flux particulier. L'adhésion réversible du phage à la surface de l'hôte peut par définition être non définitive et le phage peut être « détaché ». Cette étape permet au phage de rester à proximité de la cellule et de rechercher des récepteurs spécifiques.

Il existe une grande diversité parmi les récepteurs. Chez les bactéries à Gram négatif, il peut s'agir de protéines comme OmpF chez le phage T2 ou LamB chez lambda. Au sein d'une même espèce, des récepteurs différents sont reconnus par des phages distincts. Par exemple, les phages de Salmonelles reconnaisent les protéines FhuA, TolC, BtuB, OmpC, un antigène capsulaire Vi, les LPS ou encore les flagelles (Shin *et al.*, 2012). Chez d'autres modèles, les récepteurs sont des motifs de la paroi, ou des polysaccharides capsulaires. Ces cas sont souvent rencontrés chez les phages de bactéries à Gram positif (**Tableau I**). Les mécanismes impliqués ont été particulièrement étudiés chez les membres des *Siphoviridae* infectant les BL utilisées comme levains dans l'industrie laitière. De nombreux phages actifs sur les espèces *S. thermophilus*, *L. lactis* et *Leuconostoc sp.* ont été isolés depuis plus de trente ans à partir des matrices laitières. Ainsi, début 2017, on comptait 131 phages de Lactocoques séquencés. Leur étude a permis de décrire finement les mécanismes moléculaires gouvernant l'adsorption, et pour certains de les relier à la dépendance observée vis-à-vis de la présence de calcium dans le milieu (Mahony & van Sinderen, 2015; Mahony *et al.*, 2016). Les phages de BL reconnaissent des éléments dans la paroi (Chapot-Chartier, 2014), et la majorité cible des composants du peptidoglycane ou des acides téchoiques pour un attachment réversible. La présence

de saccharides est requise et cet élément est commun aux *Siphovirus* infectant les bactéries à Gram positif dans leur ensemble (Bertozzi Silva *et al.*, 2016).

Tableau I. Exemples de récepteurs pariétaux identifiés chez les phages infectant les bactéries à Gram positif, d'après Bertozzi Silva *et al.* (2016)

Hôte	Phage	Type de récepteur	Récepteur	Référence
Bacillus subtilis	SSP1	Protéine	Acides teichoiques de la paroi, poly(glycerophosphate) pour adhésion reversible et protéine membranaire Yue pour adhésion iréversible	Baptista *et al.*, (2008)
	φ29	AT	Acides teichoiques de la paroi	Xiang *et al.,* (2009)
Lactococcus lactis	c2	Protéine	Rhamnose du peptidoglycane pour l'adhésion réservible et protéine PIP pour l'adhésion irréversible	Valyasevi *et al.,* (1991)
	p2	Saccharide	Saccharides de la paroi pour adhésion réversible et phosphohexasaccharides pour irréversible	Bebeacua *et al.*, (2013) Tremblay *et al.*, (2006)
	bIL170	Saccharide	Inconnu	Ricagno *et al.*, (2006)
	Tuc2009	Saccharide	Inconnu	Ainsworth *et al.*, (2014)
	φLC3	Saccharide	polysaccharides de la paroi	
	TP901-1	Saccharide		
Lactobacillus delbrueckii	LL-H	AT	ALT (glucose) pour adsorption réversible et glycerophosphates des ALT chargés négativement pour adhésion irréversible	Munsch-Alatossava and Alatossava (2013)
Lactobacillus plantarum	B1	Saccharide	Galactose (des polysaccharides de paroi)	Douglas & Wolin, (1971)
	B2	Saccharide	Glucose (AT)	Douglas & Wolin (1971)
Streptococcus thermophilus	OBJ	Saccharide	Glucosamine/Ribose	Quiberoni *et al.*,(2000)
	CYM	Saccharide	Glucosamine/Rhamnose	Quiberoni *et al.*,(2000)

AT : Acide téichoïque
ALT : acide lipotéichoïque

Les analyses de génomique comparative ont facilité l'identification des gènes codant pour les composants phagiques permettant d'établir l'interaction spécifique avec le récepteur de l'hôte. Le composant majeur est la protéine RBP (receptor-binding protein). Les RBP des phages de Lactocoques s'organisent en cinq groupes et les membres des groupes reconnaissent des structures de paroi distinctes. D'autres composants structuraux entrent en jeu dans le processus d'adhésion, comme les protéines de la plaque basale (ou baseplate), qui constituent une structure en « trépied ». La région génétique codant pour ces éléments comprend le gène de la TMP (tail tape measure protein), la distal tail protein (Dit), et la tail-associated lysin (Tal) (**Figure 5 A**). Des différences de structure sont néanmoins visibles parmi les phages de Lactocoques (**Figure 5 B**). La plaque basale du phage p2 subit une modification de conformation avant l'attachment. Elle serait déclenchée ou stabilisée grâce aux ions Ca^{2+} ce qui correspondrait à un mécanisme d'activation de la plaque basale durant l'adhésion du phage à son hôte (Sciara *et al.*, 2010; Veesler *et al.*, 2012). Ce mécanisme oriente le RBP en direction de l'hôte (la rotation est de 200°) et n'est pas observée chez le phage TP901-1 par exemple qui est de façon permanente dans une orientation « prête à adhérer » (Spinelli

et al., 2014). Selon Mahony *et al.* (2017), une telle dichotomie (avec/sans activation) serait répandue chez les phages de BL et au-delà.

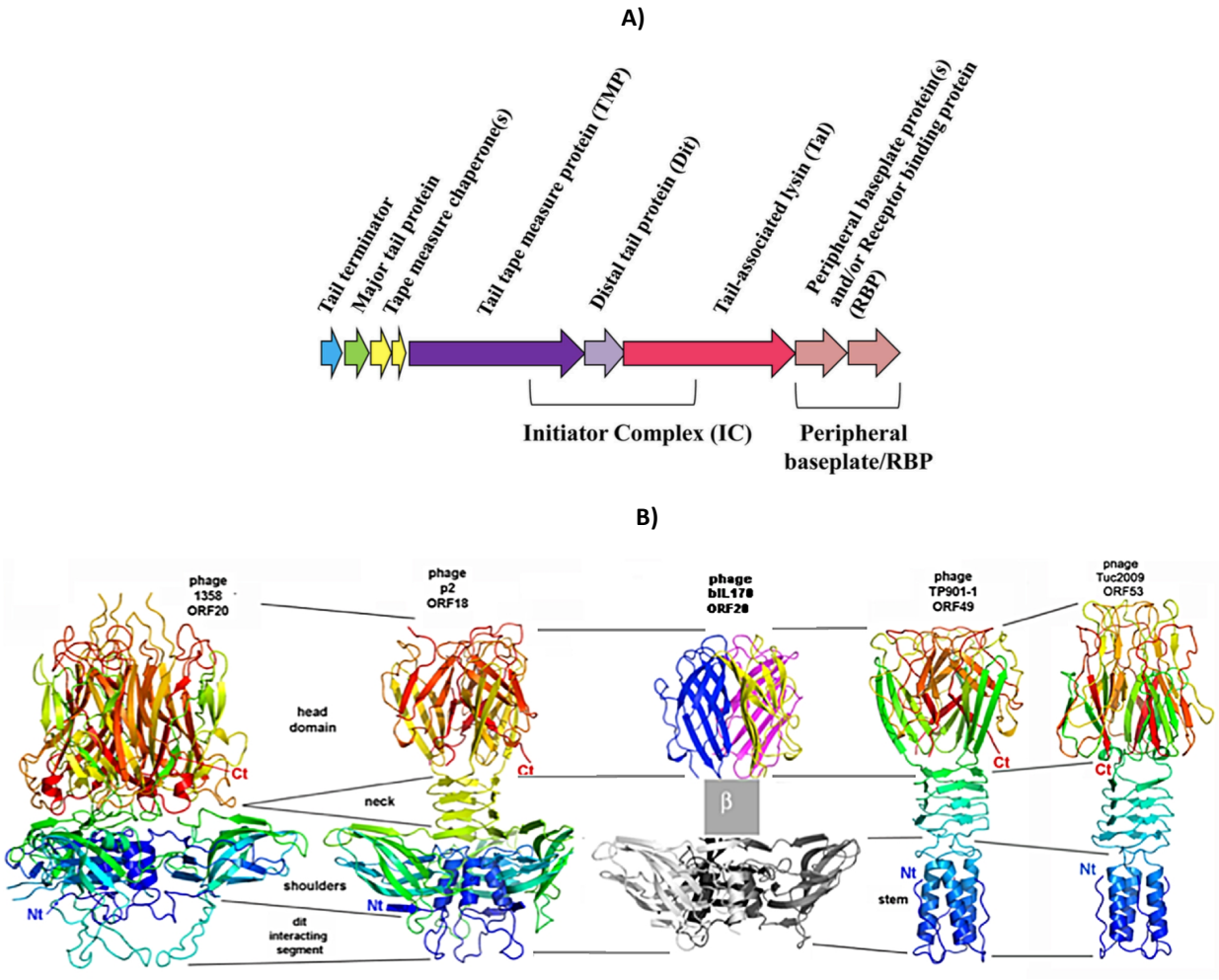


Figure 5. Schéma de l'organisation génomique du module de morphogénèse de la queue chez les Siphoviridae infectant les lactocoques (A) et structures des RBPs de cinq phages de Lactocoques pour lesquels les structures ont été résolues : 1358; p2; bIL170, TP901-1 et Tuc2009 avec la tête, le cou (lorsque présent) et les domaines dits en épaule (Mahony *et al.*, 2016).

La protéine Dit de la plaque basale possède un domaine lui permettant de dégrader la paroi cellulaire, ce qui va faciliter l'injection de l'ADN phagique. Dieterle *et al.* (2017) observent sur le prophage PLE3 et les phages J-1 et PL-1 de *Lb. casei* l'insertion de domaines de fixation aux carbohydrates (CBM) (Dieterle *et al.*, 2014, 2017) (**Figure 6**), et introduisent le concept de Dit « évoluée ».

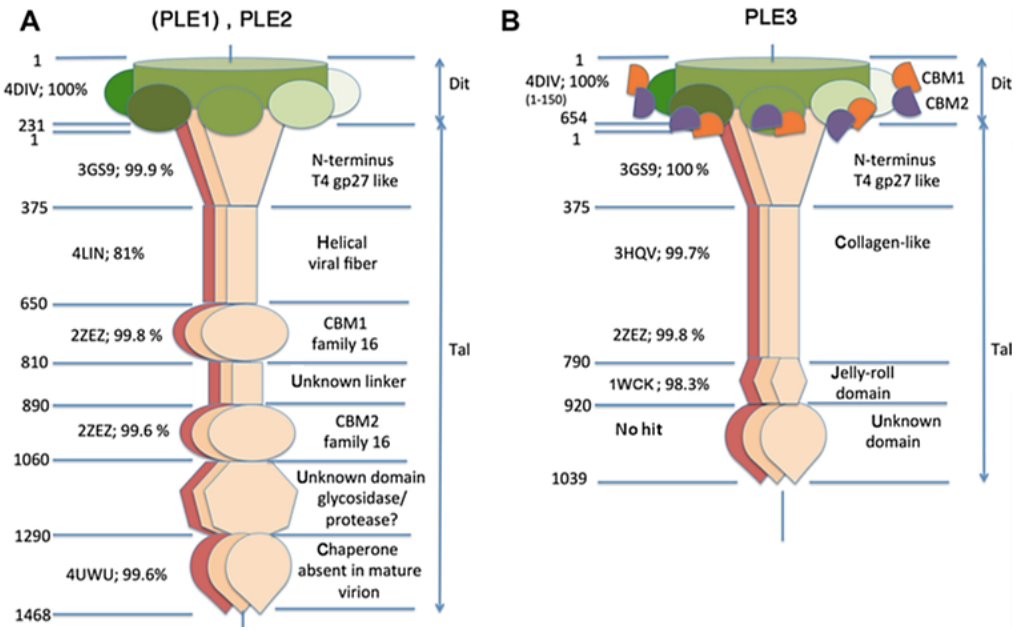


Figure 6. Schéma des protéines de la plaque basale des prophages de *Lb. casei* (Dieterle *et al.*, 2017).

2. Le cycle lytique

Après l'adsorption du phage à la surface de la cellule, l'ADN est injecté. L'expression de gènes précoces du phage va initier le cycle lytique, caractéristique des phages virulents. La réplication du génome phagique se fait par détournement de la machinerie cellulaire de son hôte. L'assemblage des constituants protéiques va permettre l'encapsidation du matériel génétique dans la capside puis l'attachement de la partie caudale du phage. Les virions néoformés vont être libérés grâce à l'action de l'endolysine (ou lysine) et de la holine. Cette dernière va former des pores dans la membrane et permettre à la lysine d'accéder au peptidoglycane pour le dégrader, provoquant la lyse cellulaire. Les nouvelles particules virales libérées peuvent alors infecter d'autres bactéries (**Figure 7**).

Différents paramètres tels que la vitesse d'adsorption, ou période de latence, ainsi que la *burst size,* qui définit la quantité de virions libérés pour chaque cellule infectée, permettent de caractériser le degré de virulence d'un phage donné (Ellis & Delbrück, 1939).

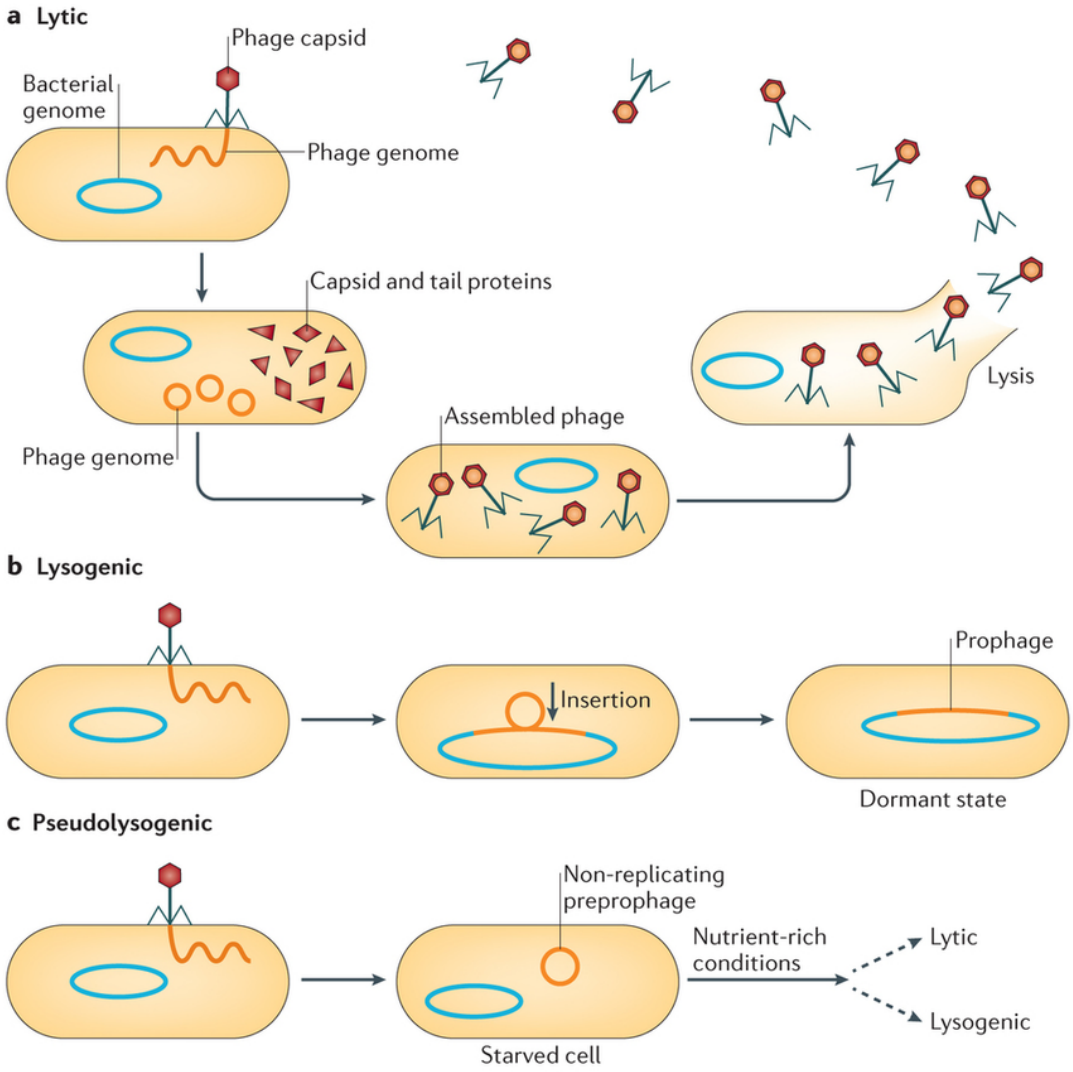


Figure 7. Les différents cycles de réplication des phages (Feiner *et al.*, 2015)**. a.** Le cycle lytique. Le génome est répliqué et les protéines de capside et caudales sont produites grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte afin de former de nouveaux virions, libérés par la lyse bactérienne. **b.** le cycle lysogénique. Le génome phagique est intégré au chromosome bactérien et persiste au cours des divisions cellulaires. Il n'y a ni mort cellulaire, ni production de particules virales. **c.** le cycle pseudolysogénique. C'est un état instable durant lequel le phage reste à l'état d'épisome et n'établit pas de véritable lysogénie puisqu'il n'est pas intégré au génome bactérien.

3. Le cycle lysogénique

Le génome phagique injecté dans la cellule va intégrer le chromosome bactérien. Le phage intégré prend alors le nom de « prophage » (**Figure 7**). Le cycle lysogénique est caractéristique des phages dits « tempérés ». Au contraire, les phages lytiques sont dépourvus de module d'intégration, contenant les gènes nécessaires à l'intégration et au maintien de la lysogénie. L'intégration est réalisée grâce à l'action d'une intégrase virale qui agit simultanément au niveau d'un site localisé sur le chromosome bactérien (*attB*) et sur le génome phagique (*attP*). La recombinaison est dite site spécifique (RSS) en raison du caractère unique de ces sites chez chaque partenaire (**Figure 8**). Les

intégrases sont regroupées en deux familles selon le site catalytique utilisé, à tyrosine ou à sérine. Les intégrases à tyrosine peuvent reconnaître de longues séquences d'ADN et requièrent l'action d'autres facteurs phagiques ou bactériens. Au contraire, les intégrases à sérine reconnaissent des séquences *att*B plus courtes, et sont capables de fonctionner seules.

Une fois intégré, le prophage va ensuite être répliqué avec le génome de son hôte.

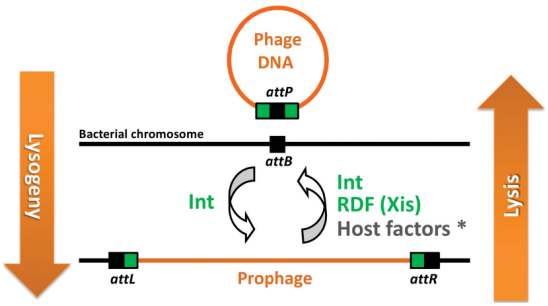


Figure 8. Intégration et excision du prophage pendant la RSS (d'après Menouni *et al.*, 2015). Le phage produit des facteurs (en vert) qui sont l'intégrase (Int) qui catalyse la réaction de RSS dans les deux directions, et le facteur Xis impliqué uniquement dans l'excision. Les facteurs de l'hôte (en gris) sont par exemple des protéines chaperones. Le rapport de concentration Int/Xis va guider le sens de la réaction.

3.1. Mise en évidence de la lysogénie

Utilisation d'agents inducteurs

L'étude de la lysogénie et des prophages s'appuie largement sur l'utilisation d'agents inducteurs. Les plus utilisés sont la mitomycine C (MC), le traitement aux rayons UV, et le choc thermique (Nanda *et al.*, 2015, Ho *et al.*, 2016). Le stress oxydatif *via* l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que l'exposition à des antibiotiques (particulièrement les fluoroquinolones) sont également connus pour leur action inductrice (Bearson & Brunelle, 2015, Ho *et al.,* 2016). L'induction de phages de *L. lactis* est obtenue en mettant des cultures en phase exponentielle de croissance en contact avec différentes concentrations de MC (dont un témoin négatif sans le composé). La densité optique (DO_{600nm}) est suivie pendant 8h. L'induction d'un prophage en présence de MC entraîne la lyse bactérienne et la chute de DO_{600nm}. Les phages induits peuvent ensuite être isolés et purifiés grâce à la technique de la double-couche.

Les limites de l'utilisation d'agents inducteurs sont surtout liées à l'étape d'isolement. Pour cela, une souche sensible doit être identifiée et disponible. Ainsi Oliveira *et al.* (2017) propose de coupler la technique de la double-couche à la détection des particules virales par cytométrie en flux. La MET permet également de visualiser voire d'identifier les phages mais requiert des étapes de propagation

sur une souche sensible, des étapes plus longues de préparation de l'échantillon à observer, ainsi qu'un équipement coûteux.

Enfin, tous les prophages ne sont pas inductibles. Il existe des prophages, désignés comme « cryptiques », qui sont défectifs. Cette domestication des phages a été largement documentée chez *E. coli* par exemple (Bobay *et al.,* 2014).

Approches moléculaires

L'essor du séquençage de génomes bactériens a permis de découvrir un nombre considérable de prophages et de décrire leur site d'insertion. Par exemple, l'outil PHASTER disponible en ligne (http://phaster.ca/) permet d'identifier et d'annoter rapidement les séquences prophagiques complètes et incomplètes dans un génome bactérien. Les études de génomique comparative de ces prophages ont conduit à une meilleure connaissance de l'ensemble des gènes présents et de leur organisation, ainsi qu'au développement d'approches PCR pour les détecter. De plus, le développement d'approches « omiques » (métagénomique, métatranscriptomique ou métaprotéomique) accroît également les connaissances liées aux prophages (Howard-Varona *et al.*, 2017).

3.2. Le choix lyse/lysogénie

Lorsqu'un bactériophage tempéré infecte une bactérie, il a le choix entre deux cycles de développement : le cycle lytique ou le cycle lysogénique. Ce choix est appelé commutation lyse-lysogénie.

Le paradigme du commutateur génétique phagique lyse-lysogénie a été particulièrement décrit chez le bactériophage lambda (λ) *d'Escherichia coli,* qui sert de référence. Chez λ, le destin du phage dans la cellule va dépendre de la compétition entre les protéines Cro et CI, codés par les gènes *cro* et *cI* respectivement.

Le choix lyse/lysogénie peut être influencé par des paramètres de l'environnement, comme la température (Bednarz *et al.*, 2014; Shan *et al.,* 2014) ou l'exposition aux ultra-violets (UV). Les UV, comme les agents mutagènes chimiques, vont induire l'excision du prophage. Les dommages provoqués à l'ADN vont provoquer l'activation du système de réparation SOS de l'hôte et activer la protéine RecA. Cette protéine va cliver le répresseur CI du prophage, ce qui va ensuite initer le cycle lytique (Casjens & Hendrix, 2015).

Dans certains modèles bactériens, l'induction serait sous contrôle de systèmes de *quorum-sensing,* qui est un phénomène dépendant de la densité de la population et qui régule l'expression de divers

phénotypes (motilité, formation biofilm, production de toxines…). Les acyl-homosérine lactones (AHL) sont des molécules signal produites par de nombreuses bactéries à Gram négatif. Ghosh *et al.* (2009) ont montré que l'ajout d'AHL provoque l'induction de prophages de bactéries isolées d'échantillons de sol. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* produit de l'AHL, qui induit le prophage PAO1, mais également le phage λ lorsque *E. coli* est présent en co-culture. L'action de l'AHL chez λ n'impliquerait pas la réponse SOS mais s'exercerait plutôt *via* le récepteur de l'AHL (*sdiA*), et un régulateur transcriptionnel de la synthèse d'exopolysaccharides (*rcsA*) (Ghosh *et al.*, 2009). Le mécanisme est également décrit chez *E. faecalis* et influence la dissémination des biofilms (Rossmann *et al.*, 2015).

Récemment, l'équipe de Rotem Sorek de l'institut Weizmann (Israël) a décrit un système de « communication virale » qui assure la coordination de la « décision » lyse/lysogénie chez les phages du groupe SPbeta de *Bacillus subtilis* (Erez *et al.*, 2017). L'objectif initial des auteurs était d'évaluer si les bactéries ayant été infectées par un phage produisaient des molécules pour « alerter » les autres bactéries d'une infection phagique. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont infecté *B. subtilis* avec 4 phages différents et ont analysé le milieu de culture 3 heures après l'infection afin de rechercher des molécules pouvant inhiber l'infection. De façon surprenante, au lieu d'identifier une molécule produite par la bactérie, les auteurs ont trouvé une molécule synthétisée par un des phages, phi3T. Dans la cellule infectée, le phage produit cette molécule identifiée comme un peptide de communication de 6 acides aminés, relargué ensuite dans le milieu. Lors des vagues d'infection suivantes, les phages « mesurent » la concentration de ce peptide et entrent en lysogénie si la concentration est suffisamment élevée (**Figure 9**). Les différents phages produisent différentes versions de ce peptide, montrant le caractère phage-spécifique de ce mode de communication guidant le « choix » lyse/lysogénie. Cette communication est appelée le système « arbitrium ».

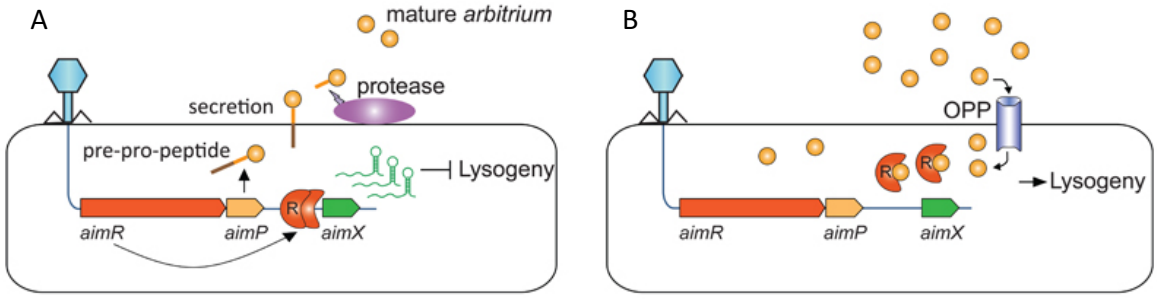


Figure 9. Le système arbitrium (Erez *et al.*, 2017). **A.** Lors de la première infection par un phage, les gènes *aimR* et *aimP* sont immédiatement exprimés. Le dimère AimR active l'expression de AimX qui est un inhibiteur de la lysogénie. Parallèlement, AimP est sécrété à l'extérieur de la cellule et devient le peptide mature appelé *arbitrium*. **B.** Au fil des infections, le peptide s'accumule dans le milieu et est internalisé par la bactérie. Le récepteur AimR se lie à l'arbitirum et ne peut plus activer AimX, ce qui mène à l'entrée des phages en lysogénie.

3.3. Avantages et inconvénients liés à la lysogénie

Les prophages ont longtemps été décrits comme des entités « dormantes ». Pourtant, ils peuvent affecter l'hôte, aussi bien au niveau de sa physiologie qu'au niveau de sa population (Howard-Varona *et al.,* 2017).

Avantages pour la bactérie

Certains prophages portent des gènes codant pour des protéines qui vont augmenter le fitness de l'hôte (Nanda *et al.*, 2015). Ce phénomène est appelé « conversion lysogénique ». Ils peuvent notamment conférer une résistance envers d'autres phages semblables (grâce au répresseur, qui confère l'immunité à la surinfection),) ou à la présence de gènes de type Sie (Ali *et al.*, 2014; Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Chez *S. aureus*, le phage TEM123 véhicule la résistance aux β-lactamines (Lee & Park, 2016). Les prophages peuvent également porter des gènes codant pour des facteurs de virulence ou d'adhésion (Feiner *et al.,* 2015). Ces derniers cas ont été détaillés par Davies *et al.* (2016). Les exemples les plus connus sont la toxine diphtérique, acquise *via* le phage β chez *Corynebacterium diphtheriae* (Holmes & Barksdale, 1969) ou encore la toxine cholérique, acquise *via* le phage CTX chez *Vibrio cholerae* (Faruque *et al.,* 1998). Les phages Gifsy 1 et 2 portent des fonctions qui aident S*. typhimurium* à se défendre des macrophages lors d'une infection en modèle souris (Figueroa-Bossi & Bossi, 1999). Les gènes de virulence sont souvent portés par les « morons » des prophages. Ces morons peuvent être identifiés par génomique comparative, car il s'agit de gènes « ajoutés » qui viennent rompre la continuité d'une région d'ADN associée à une même fonction (Fortier & Sekulovic, 2013). Ils présentent généralement un pourcentage en G+C différent de celui du prophage, ce qui marque un transfert horizontal récent. Des systèmes de résistance aux phages, tels que les systèmes Sie, ont également été mis en évidence sur les morons (Cumby *et al.,* 2012).

Parfois c'est la capacité des prophages à s'exciser dans certaines conditions qui peut être un facteur de fitness. Les populations de souches lysogènes peuvent connaître un évènement contrôlé de lyse de quelques bactéries. Ceci provoque la mort des cellules et la libération de phages qui peuvent à leur tour tuer d'autres souches compétitrices dans la niche. Chez *S. pneumoniae*, l'induction spontanée d'une partie de la population apporte une source conséquente d'ADN qui consolide la matrice du biofilm et la survie du reste de la population (Carrolo *et al.*, 2010). Chez *Listeria monocytogenes*, le prophage A118-like est inséré dans le gène *comK*, régulateur de la compétence. L'intégration/excision du prophage en lysogénie active va fonctionner comme un « interrupteur moléculaire » dans la régulation des gènes et aura donc de larges répercussions. Il en est de même

chez certaines cyanobactéries où des prophages sont insérés dans des gènes impliqués dans la fixation d'azote (Feiner *et al.*, 2015).

Le fait que les prophages puissent conférer l'immunité aux phages homologues (Bondy-Denomy *et al.*, 2016), lyser les bactéries compétitrices (Gama *et al.*, 2013), et introduire des facteurs positifs pour l'hôte (Wang *et al.*, 2010), peut avoir des conséquences importantes sur la population bactérienne.

4. Autres cycles

Pseudo-lysogénie. Le phage, bien que disposant des fonctions intégratives, demeure à l'état d'épisome dans le cytoplasme bactérien, sans engager de cycle lytique. Il peut ainsi être éliminé au cours de cultures successives (Lood & Collin, 2011). Ce phénomène est rencontré notamment lors de carences nutritives, comme le montrent Los *et al.* (2003) chez le bactériophage T4 *d'E. coli* lors de cultures en chémostat limitées en glucose.

Carrier state. Siringan *et al.* (2014) décrivent le « carrier state life cycle » (CSCL, **Figure 10**) comme un mélange de populations de bactéries et de phages en équilibre. Une partie des bactéries est résistante et des variants sensibles sont générés afin de maintenir la population phagique.

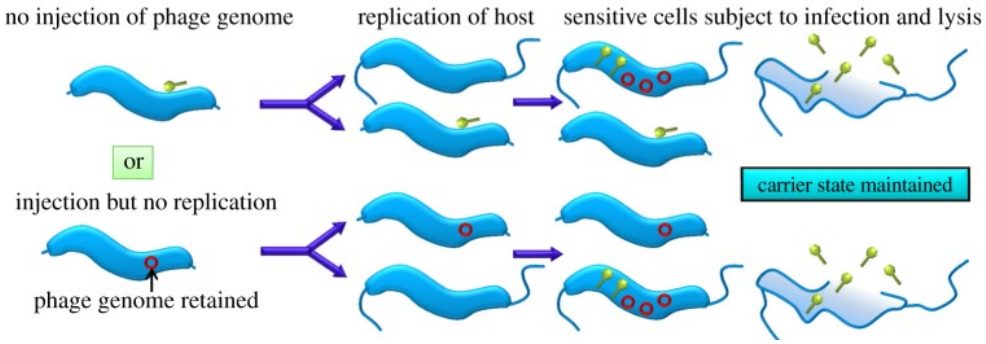


Figure 10. Carrier state (CSCL) chez *Campylobacter* (d'après Siringan *et al.*, 2014). Le CSCL permet la multiplication de cellules résistantes au phage et la production de souches sensibles qui assurent la multiplication des phages.

Parfois inclus dans la définition de la pseudolysogénie, le CSCL a pourtant été rapporté dans la littérature chez *Shigella dysenteriae* (Li *et al.*, 1961), *Brucella abortus* (Jones *et al.*, 1962), les mycobactéries (Baess, 1971), et récemment chez *Salmonella typhimurium* (Cenens *et al.*, 2013) , ainsi que chez des *Levivirus* de *Pseudomonas aeruginosa* (Pourcel *et al.*, 2017). Cet état est

particulièrement étudié chez les phages de *Campylobacter* (Brathwaite *et al.*, 2015; Hooton *et al.*, 2016; Siringan *et al.*, 2014) .

Nouvelles propositions de terminologie

La diversité des cycles de vie des phages a été récemment revue par Hobbs et Abedon (2016), qui proposent des terminologies plus descriptives et distinctives. Ces auteurs suggèrent de répartir les phages en 4 catégories selon si le relargage de nouveaux virions est observé (infection productive) ou non, les modalités de relargage (lyse ou chronique) et la nature de l'équipement génétique utile à la lysogénie (**Figure 11**).

Les auteurs classent ainsi les phages en 4 catégories : (I) les phages strictement lytiques, qui ne sont pas capables de lysogéniser leur hôte, et vont s'encapsider entracellulairement, avec le relarguage des virions, (II) les phages relargués de façon chronique qui ne réalisent pas de cycle lysogénique, qui vont cette fois s'encapsider au moment du relarguage des virions, (III) les phages lytiques capables de lysogénie (par exemple les phages tempérés), et dont la production de virions matures nécessite une encapsidation avant relarguage, et (IV) les phages relargués de façon chronique, pouvant réaliser un cycle lysogénique (et qui sont également des phages tempérés).

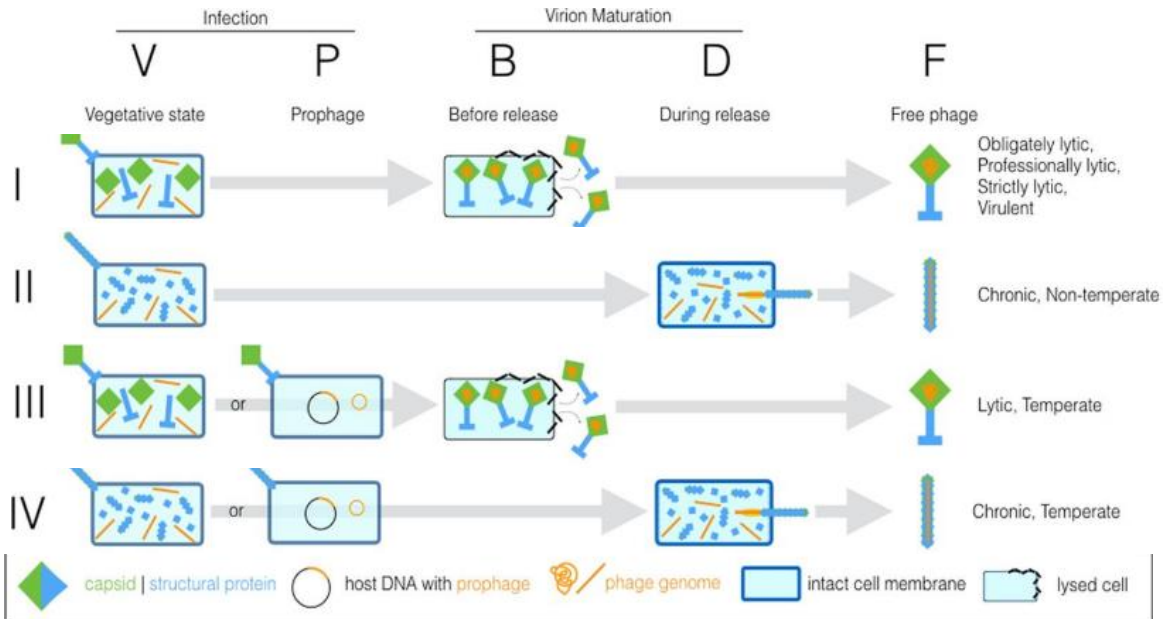


Figure 11. Classification des phages selon le mode d'infection et de relargage des nouveaux virions (Hobbs & Abedon, 2016). La phase végétative (V) désigne un cycle productif, alors que l'état de prophage (P) marque la capacité du phage à lysogéniser son hôte. Le génome du phage peut être encapsidé avant le relargage (B), ou pendant le relargage (D), pour former de nouveaux phages libres (F).

Les auteurs soulèvent la limite d'utiliser les termes « lytique ou tempéré » pour classer les phages, et apportent une classification plus discriminante. En effet, la grande majorité des phages tempérés peuvent effectuer un cycle lytique et ainsi réaliser une infection productive. En outre, le terme « virulent » est souvent préféré pour désigner les phages lytiques, non tempérés d'après la définition de Lwoff (1953). Ce terme est ambigu car des phages virulents peuvent inclure les phages tempérés. Il existe des « mutants virulents », dérivés de phages tempérés et défectifs, ayant perdu la capacité de lysogéniser. Les auteurs proposent d'utiliser les termes « strictement/professionnellement lytique » pour éviter toute ambiguïté.

Partie III. Prédation des bactéries par les phages

1. Les phages destructeurs de levains en fermentation

La famille des bactéries lactiques (BL) rassemble des bactéries à Gram positif très répandues et d'origines très diverses (végétaux, alimentaires, tractus gastro-intestinal). De nombreuses BL participent à la fabrication de nos denrées alimentaires et la présence de phages est connue pour entraîner des ralentissements ou des arrêts de fermentation, impactant la qualité du produit. On estime aujourd'hui qu'entre 0,1 et 10 % des fermentations lactiques sont concernées par des problèmes liés aux phages (Mc Grath *et al.*, 2007). En effet, quelques souches seulement sont inoculées dans une matière première thermisée, ce qui rend les attaques plus dangereuses. Les volumes les plus conséquents de préparation et de vente de levains concernent les espèces *Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus et Lactobacillus spp*, qui sont impliquées dans les productions laitières.

En production, les attaques phagiques ciblent les flores responsables de l'acidification, et certaines flores d'aromatisation comme le genre associé *Leuconostoc.* Les phages des bactéries du genre *Leuconostoc* associées à l'environnement laitier sont de plus en plus étudiés, et les études concernent les phages lytiques (Pujato *et al.*, 2015, 2017).

Malgré les dispositions prises au sein des usines (nettoyage, maîtrise de la contamination aéroportée...), les attaques virales y sont récurrentes. Les phages sont présents dans le lait cru, l'air, et sont concentrés dans les lactosérums et poudres de lait, dans lesquels ils persistent durablement

(Wagner *et al.*, 2017). La lutte contre ces phages s'appuie sur l'utilisation de souches commerciales naturellement résistantes, proposées en schéma de rotations (Samson & Moineau, 2013).

Tableau II. Quelques exemples de phages de bactéries lactiques récemment isolés et caractérisés.

Phage	Hôte	Fermentation ou Procédé	Groupe Leader	Localisation	Références
5095	*S. thermophilus*	Lait	D. Van Sinderen	UCC, Cork (IRL)	McDonnell *et al*., 2016
Q69	*E. faecalis*	fromage	M.A. Alvarez	IPLA-CSIC, Villaviciosa, (SP)	
	L. mesenteroides	lait	A. Quiberoni	Santa Fe (ARG)	Pujato *et al.*, 2017
	L. mesenteroides	lait	K. Vogensen	U. Copenhague (D)	Muhammed *et al.*, 2017a et b
	L. mesenteroides	Poudre de lait	H. Neve/K. Heller	U. Kiel (DE)	Wagner *et al*., 2017
	L. pseudomesenteroides	lait	Andrea Quiberoni		
	L. pseudomesenteroides		K. Vogensen	U. Copenhagen (D)	Muhammed *et al.*, 2017a et b
	O. oeni	Vin/moût	C. Le Marrec	EA Œnologie, Bordeaux (F)	Jaomanjaka *et al.*, 2013
	Weissella paramesenteroides	Végétaux/ Concombre	F. Breidt	U. Georgia (USA)	Lu *et al*., 2012
	Weissella cibaria	Végétaux/ Concombre	F. Breidt	U. Georgia (USA)	Lu *et al.*, 2012
	Weissella cibaria	Végétaux/ Kimchi	H. Klepen/Holo	Aas (NO)	Kleppen *et al.*, 2012
	L. mesenteroides	Végétaux/ Kimchi		U. Kyung Hee, Seoul (KOR)	Jung *et al*., 2011; Park *et al.*, 2011
	L. mesenteroides	Crevettes		U. Kyung Hee, Seoul (KOR)	Park *et al.*, 2011
	L. mesenteroides	Choux		U. Kyung Hee, Seoul (KOR)	Park *et al.*, 2011
	L. gelidum	Porc	H. Ackermann	Lacombe Research Centre (CAN)	Greer *et al*., 2007
	Carn. divergens	Bœuf émincé	-	U. Wales (UK)	Manchester, 1997
	P. ethanolidurans	Concombre	F. Breidt	U. Georgia (USA)	Lu *et al.*, 2012
EcoSau ; EcoInf	*Lb. fermentum*	Bioéthanol	E.J. Summer	Ecolyse Inc. (USA)	Liu *et al.*, 2015
B1	*Lb. fermentum*	Bioéthanol	D. Sauvageau	U. Alberta (CAN)	Bertozzi-Silva *et al.*, 2014
EV3	*Lb. sanfranciscensis*	Sourdough	R . Vogel	Tech. U. München (DE)	Ehrmann *et al.*, 2013

Les phages associés aux fermentations de produits végétaux sont moins bien décrits. Des phages infectant *Leuconostoc mesenteroides*/*paramesenteroides* isolés de choux et de radis fermentés (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 pains au levain ou *sourdough* (Foschino *et al.*, 2005). Dans le vin, l'existence de phages infectant l'espèce *O. oeni*, responsable de la FML, est connue depuis 1976 (Sozzi *et al.*, 1976). Cependant dans ces secteurs, le lien causal entre la présence de phages et le déroulement anormal de la fermentation n'est pas établi.

2. Les phages acteurs du bio-contrôle

Il existe une réelle attente quant à la mise au point de nouvelles armes (i) pour lutter contre les flores pathogènes ayant développé des antibio-résistances, ou (ii) pour être plus respectueux de l'environnement et du consommateur en limitant les intrants chimiques utilisés dans les procédés de

production pour le contrôle des flores indésirables. Ceci suscite un nouvel intérêt pour l'utilisation des phages comme outil de bio-contrôle. La terminologie de « bio-contrôle » est envisagée pour diverses applications, notamment la production de matières premières et leur transformation en denrées alimentaires (agriculture, pisciculture, produits fermentés) ou de traitements sanitaires (eaux usées par exemple). Plus spécifique, le terme de « phagothérapie » est réservé aux applications médicales (chez les humains et les animaux).

L'intérêt des phages est le fait qu'ils sont sans effet sur les cellules animales (rats) et les humains, car sont spécifiques des bactéries (Bruttin & Brüssow, 2005; Carlton *et al.*, 2005; Hagens & Loessner, 2014). Ils ont la capacité de s'auto-perpétuer en présence de bactéries et sont actifs sur des cellules en mode planctonique ou établies au sein de biofilms (Gutiérrez *et al.*, 2016). Les phages lytiques sont retenus, et les études portant sur les récepteurs reconnus par les phages sont importantes dans ce domaine car elles permettent (i) de créer des mélanges ou « cocktails » de phages à spectre large, et (ii) de réduire les phénomènes de résistance (Frampton *et al.*, 2014).

2.1. Applications médicales

Les phages lytiques ont rapidement été envisagés comme agents antibactériens par Felix d'Hérelle, en 1919, qui a démontré leur capacité à traiter les patients atteints de dysenterie à l'Hôpital des Enfants-Malades de Paris (Wilkinson, 2001). Cette approche de l'ère pré-antibiotique est ainsi appelée la thérapie par les phages ou phagothérapie. Elle a été progressivement abandonnée avec la découverte et la commercialisation des antibiotiques, sauf dans certains pays comme la Géorgie (Institut Eliava), la Pologne (Institut Hirszfeld), et la Russie, où la phagothérapie est toujours pratiquée depuis des décennies au sein de centres de recherche de référence. Dans un contexte de crise lié à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, la thérapie par les phages est de nouveau envisagée comme une méthode alternative et complémentaire. Des études s'intéressent ainsi à l'efficacité d'un traitement combinant l'utilisation d'antibiotiques et de phages. Une action synergique a été démontrée (Comeau *et al.*, 2007; Torres-Barceló *et al.*, 2016). Plusieurs études rapportent l'efficacité des phages, notamment dans le traitement d'infections pulmonaires (Abedon, 2015; Dufour *et al.*, 2015). En outre, la phagothérapie peut s'avérer efficace de façon préventive, comme l'ont montré Debarbieux *et al.* (2010) chez la souris, en administrant une suspension de phages par voie nasale, 24h avant une infection à *Pseudomonas aeruginosa*.

Avantages

Les bactériophages sont spécifiques d'une espèce voire d'un genre bactérien. Contrairement aux antibiotiques, ils peuvent préserver la flore bénéfique de certains microbiomes. De plus, avec le recul d'un siècle d'étude, l'innocuité des préparations phagiques utilisées a été confirmée, à condition qu'elles soient suffisamment purifiées. En effet, une solution de phages est obtenue à partir d'un lysat bactérien, riche en produits de dégradation bactériens particulièrement immunogènes. Une étape de purification plus ou moins poussée selon le mode d'administration reste indispensable (Miernikiewicz *et al.*, 2013).

D'autre part, les phages s'avèrent plus efficaces que les antibiotiques dans le traitement de bactéries formant des biofilms. L'hydrolyse des polysaccharides bactériens impliqués dans l'adhésion et la formation de ces biofilms est réalisée grâce à des dépolymérases situées sur les fibres de la queue de certains phages (Pires *et al.*, 2016), ce qui va faciliter leur diffusion jusqu'aux récepteurs. Enfin, l'isolement de nouveaux phages virulents s'avère plus aisé et plus rapide que la recherche d'une nouvelle molécule antibiotique.

Limites

De nombreuses limites sont liées à la spécificité des phages. La réactivité en cas d'infection aïgue est limitée, car il est nécessaire d'isoler la/les souches responsables, d'isoler un ou plusieurs phages et de le produire en grande quantité. Le traitement doit inclure le suivi d'apparition de souches résistantes, afin de pouvoir changer éventuellement de phage pendant le traitement.

L'utilisation de phages pour traiter les bactéries à développement strictement intracellulaires est à ce jour impossible, puisque les phages sont incapables d'entrer dans les cellules eucaryotes. Il est envisagé de procéder à l'encapsulation des phages dans des liposomes pour qu'ils traversent la membrane plasmique (Dufour & Debarbieux, 2017). La phagothérapie est également inadaptée pour traiter les infections neuro-méningées, car la diffusion vers le système nerveux central est bloquée par la barrière hémato-encéphalique, ou dans le traitement d'infections plurimicrobiennes (par exemple la péritonite). La phagothérapie serait plus adéquate au traitement des pneumonies, des infections urinaires, ostéoarticulaires, ou des brûlures infectées (Communication orale d'Alain Dublanchet, French phage Network 2016). Il est à noter que des approches indirectes, basées sur l'utilisation de lysines virales sont en cours d'étude. Shen *et al.* (2013) ont pu démontrer que des endolysines phagiques traversent la barrière épithéliale des cellules et éliminent des Streptocoques pathogènes intra-cellulaires.

Enfin, il existe une entrave majeure au développement d'essais cliniques, due à l'absence de cadre législatif autour de l'utilisation de virus ainsi que les coûts de production dissuasifs liés aux normes qui sont jugées inadaptées à la phagothérapie. Néanmoins, des essais thérapeutiques sont actuellement en cours : l'essai PhagoBurn pour le traitement des infections cutanées à *P. aeruginosa* et *E. coli* chez les patients brûlés a lieu à Bordeaux, et l'essai PHOSA, pour le traitement des infections ostéo-articulaires à *S. aureus* et *S. epidermidis* se déroule dans les hôpitaux de Lyon. En 2017, le projet PneumoPhage a également débuté au sein de la société Pherecydes Pharma, visant à appuyer l'utilisation de phages inhalés dans la prise en charge des infections respiratoires à *P. aeruginosa*.

2.2. Applications en agro-alimentaire et agriculture

Les demandes liées à la production alimentaire augmentant avec la population mondiale, l'impact des maladies sur les cultures doit être réduit. Les pertes de production liées aux agents pathogènes de plantes sont estimées à 10% (Strange & Scott, 2005). Il existe plus de 200 espèces bactériennes phytopathogènes qui appartiennent majoritairement aux genres *Pseudomonas, Ralstonia, Agrobacterium, Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pectobacterium*, et *Dickeya* (Mansfield *et al.*, 2012).

De même qu'en phagothérapie, Mallmann et Hemstreet (1924) ont montré très tôt qu'un filtrat de chou décomposé pouvait être utilisé pour inhiber *Xanthomonas campestris,* suggérant l'intervention de virus. Les premiers essais aux champs par Thomas en 1935 ont montré que l'on pouvait réduire l'incidence de la maladie de Stewart en traitant les graines avec des phages actifs contre *Pantoea stewartii* (Reddy, 2012). Ce type d'études a ensuite été négligé à cause d'un manque de compréhension de la nature et de la biologie des phages (Okabe & Goto, 2003). Depuis les années 2000, un regain d'intérêt pour l'utilisation des phages a été observé. Des exemples d'études récentes sont proposés dans le **Tableau III**. En agriculture conventionnelle et biologique, la société AgriPhage (Intralytics) protège les cultures de tomates et de poivrons de l'attaque des agents pathogènes *Xanthomonas pestris* et *Pseudomonas syringae* (Żaczek *et al.*, 2015). Une approche de contrôle post-récolte assurant la protection des pommes de terre ensachées vis-à-vis de bactéries d'altération a été commercialisée en Grande-Bretagne par APS Biocontrol. Dans tous ces produits commerciaux, la stratégie suivie consiste en l'application de cocktails de phages purement lytiques (non tempérés) assurant à l'ensemble un spectre d'action large, et non-redondant. Les phages sélectionnés sont appliqués à forte dose. Un excès d'un facteur 10^3 à 10^4 par rapport au nombre de bactéries est recherché, afin de limiter l'émergence de bactéries résistantes. Il est nécessaire de réaliser des essais aux champs. En effet, bien que les modalités d'infection semblent optimales *in vitro*, ces paramètres ne sont pas nécessairement transférables aux champs (Balogh *et al.*, 2010).

Dans le domaine des industries agro-alimentaires, un ensemble de produits actifs vis-à-vis des agents pathogènes alimentaires *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* et *E. coli* (EHEC) ont été mis au point par Micreos et Intralytics, et sont utilisés comme auxiliaires technologiques (sans besoin d'étiquetage), en complément des Bonnes Pratiques d'Hygiène et de Production. A titre d'exemple, le produit Micreos^{TM} ListexP100 permet d'aider au contrôle de *Listeria monocytogenes*, qui revêt une forte priorité dans les industries alimentaires (Hagens & Loessner, 2014). Le produit bénéficie du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) auprès de la FDA américaine (administration des denrées alimentaires et des médicaments) et est autorisé depuis 2005 par les autorités sanitaires [UDDA's Food Safety and Inspection Services, FSIS Form 260-9 (6/86)] comme agent antimicrobien dans les fromages et les viandes. Son utilisation est également autorisée depuis 2012 au Canada, en Australie et en Nouvelle Zélande. En Europe, il n'y a pas encore de position officielle uniforme, mais cependant, les Ministères de la Santé danois et suisse ont d'ores et déjà rendu un avis officiel autorisant l'utilisation de la préparation ListexP100 comme additif en production alimentaire. La directive européenne 89/107 EEC pourrait être le cadre réglementaire appliqué à ce type de produits selon Pietracha & Misiewicz (2016).

Limites

Une limite importante pour l'utilisation des phages dans un cadre de bio-contrôle reste la détermination de leur spectre d'hôte. En effet, isoler un phage avec un spectre large, capable d'éliminer tous les membres d'une espèce bactérienne est un réel challenge. Fréquemment, le développement de cocktails de phages permet de surpasser cette limite. D'autre part, le développement de la formulation pour une action efficace des solutions de phages nécessite des essais conséquents sur le terrain.

Tableau III. Exemples d'études et de reviews sur le bio-contrôle depuis les années 2010.

Domaine d'application	Pathogène cible	Etude
Agriculture	*Ralstonia solanacearum*	Álvarez & Biosca, 2017
	Xylella fastidiosa	Das *et al.*, 2015
Production de bio-éthanol	*Lactobacillus*	Worley-Morse *et al.*, 2015
Fermentations laitières	*E. coli*	Tomat *et al.*, 2013
	E. faecalis	Ladero *et al.*, 2016
	Listeria	Lee *et al.*, 2017
Aquaculture	*V. harveyi*	Stalin & Srinivasan, 2017
	Flavobacterium psychrophilum	Castillo & Middelboe, 2016
Sécurité alimentaire	*S. aureus*	Chang *et al.*, 2017
	Listeria monocytogenes	Bai *et al.*, 2016
	Salmonella	Heyse *et al.*, 2015
	Camplobacter	Firlieyanti *et al.*, 2016
Traitement des eaux	*Salmonella, Vibio, E. coli, etc…*	Jassim *et al.*, 2016

Partie IV. Quelle incidence des phages pendant l'élaboration du vin ?

1. L'élaboration du vin et le rôle d'*Oenococcus oeni*.

1.1. Oenococcus et la fermentation malolactique des vins

• Le raisin utilisé pour la fabrication du vin à partir de son jus fermenté est le fruit de la vigne, *Vitis vinifera*. **Les sucres sont les constituants majeurs de la baie de raisin** et leur concentration peut atteindre à maturité une concentration de 200 à 300 g/l. La baie de raisin est riche en monosaccharides comme le glucose (~100 g/l) et le fructose (~100 g/l) et contient également de l'arabinose, du xylose et du ribose en plus faibles proportions (0,5 g/l). Les autres sources sont des polysaccharides. Ils peuvent être constitués d'unités osidiques identiques (holosides) comme l'amidon, la cellulose, ou multiples comme le saccharose et les pectines. D'autres sont liés avec des macromolécules non glucidiques, les aglycones constitués de composés phénoliques ou de précurseurs d'arômes. Les **acides organiques** sont les seconds constituants du raisin et donnent au vin son caractère acide. On y trouve l'acide tartrique (2 à 10 g/l) qui est l'acide caractéristique de la vigne. L'acide malique est produit par la baie et sa teneur diminue au cours de la maturation pour atteindre des valeurs à maturité de 2 à 7 g/l, variables selon les millésimes et les cépages. Enfin l'acide citrique est présent, mais en plus faible concentration (0,5 à 2 g/l) (Lasik, 2013). Enfin, les **composés phénoliques** sont également associés au raisin et au vin et ont une grande influence sur ses propriétés organoleptiques.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires produits par les plantes. Leurs structures chimiques sont très diverses mais ils possèdent tous un cycle benzénique substitué par au moins un groupe hydroxyle, modifié ou non. Le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les cycles peuvent varier. Deux catégories principales peuvent être distinguées selon leur squelette carboné : les non-flavonoïdes (regroupant des acides hydroxycinnamiques et des acides benzoïques, des stilbènes ou encore des tanins hydrolysables), et les flavonoïdes (**Figure 12**).

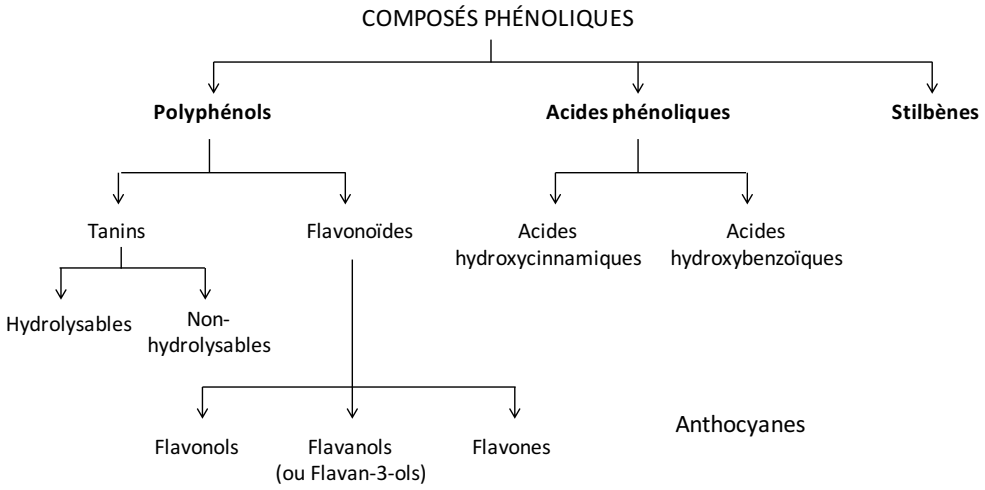


Figure 12. Classification des composés phénoliques du vin

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de deux cycles aromatiques en C6 reliés par un chaînon à trois carbones (**Figure 13**). Ils se répartissent en sous-groupes dont les flavones, les flavonols (dont la quercétine), les flavan-3-ols et les anthocyanes.

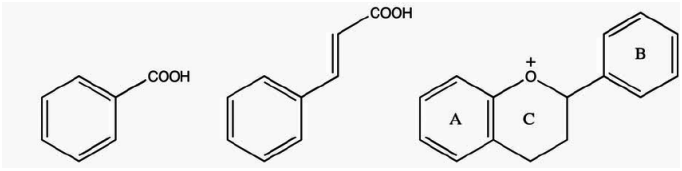
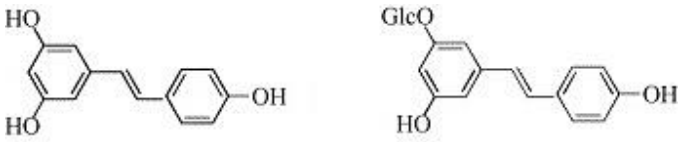


Figure 13. Structures de base des acides phénoliques et des flavonoïdes (Khoddami *et al.*, 2013)

Les non flavonoïdes peuvent être séparés en deux groupes : les acides phénoliques [acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et hydroxycinnamiques (C6-C3)] et les stilbènes. Ces derniers présentent au minimum deux noyaux benzéniques reliés par une double liaison (C6-C2-C6). Le monomère de base, chez la vigne, est le *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène ou *trans*-resvératrol **(Figure 14a**). Les stilbènes sont présents dans toutes les parties de la vigne (Bavaresco & Fregoni, 2001; Wang *et al.*, 2010). A partir du *trans*-resvératrol, d'autres stilbènes peuvent être formés soit par isomérisation, par glycosylation (ex. le picéide) ou par oligomérisation (ex. l'ε-viniférine) (**Figure 14b)**.



trans-resvératrol *trans*-picéide

Figure 14. Structure de deux stilbènes (Vian *et al.*, 2005)

La vigne, *Vitis vinifera* L., est riche en composés phénoliques tant au niveau des feuilles, des organes pérennes que dans les baies de raisin qu'elle produit. Dans le vin, les composés phénoliques proviennent essentiellement des parties solides de la baie (pellicule et pépins) et sont extraits au cours de la fermentation et de la macération. Ainsi leur contenu (type de composés, quantité) varie selon le cépage, les itinéraires techniques menés pour la culture de la vigne, les conditions climatiques, le sol ou encore le mode de vinification, avec éventuellement la présence de composés phénoliques d'origine des bois utilisés pour le stockage du vin pendant son élevage (Ribéreau-Gayon & Dubourdieu, 1998). Ainsi, les quantités en composés phénoliques vont varier considérablement selon le type de vin. Un exemple de quantités retrouvées par catégories de composés phénoliques est proposé dans le **Tableau IV**.

Environ 1260-2927 mg/l de polyphénols sont présents dans les vins rouges (Granato *et al.*, 2010) dont 85% sont des flavonoïdes.

Tableau IV. Liste de composés phénoliques quantifiés par HPLC dans un vin rouge italien (mg/L) (Ghiselli et al., 1998).

free anthocyanins	191 mg	phenolic acids	494 mg
delphinidin-3-*O*-glucoside	22 mg	caffeic acid	17 mg
cyanidin-3-*O*-glucoside	38 mg	*p*-coumaric acid	22 mg
petunidin-3-*O*-glucoside	18 mg	ferulic acid	19 mg
peonidin-3-*O*-glucoside	32 mg	vanillic acid	8 mg
malvidin-3-*O*-glucoside	69 mg	*p*-hydroxybenzoic acid	20 mg
malvidin-3-(6-*O*-*p*-coumaroyl)glucoside	12 mg	gallic acid	320 mg
flavonols	65.3 mg	protocatechuic acid	88 mg
quercetin-3-glucoside	21 mg	catechins and procyanidins	440 mg
quercetin-3-glucuronide	19 mg	(+)-catechin	145 mg
quercetin	5 mg	(−)-epicatechin	128 mg
myricetin-3-glucoside	2.3 mg	procyanidin B3	66 mg
kaempferol-3-glucoside	12 mg	procyanidin B1	29 mg
kaempferol	6 mg	procyanidin B6	12 mg
hydroxycinnamoyltartaric acids	334 mg	procyanidin B2	30 mg
caffeoyltartaric acid	178 mg	procyanidin B7	18 mg
p-coumaroyltartaric acid	139 mg	procyanidin C1	12 mg
feruloyltartaric acid	27 mg		

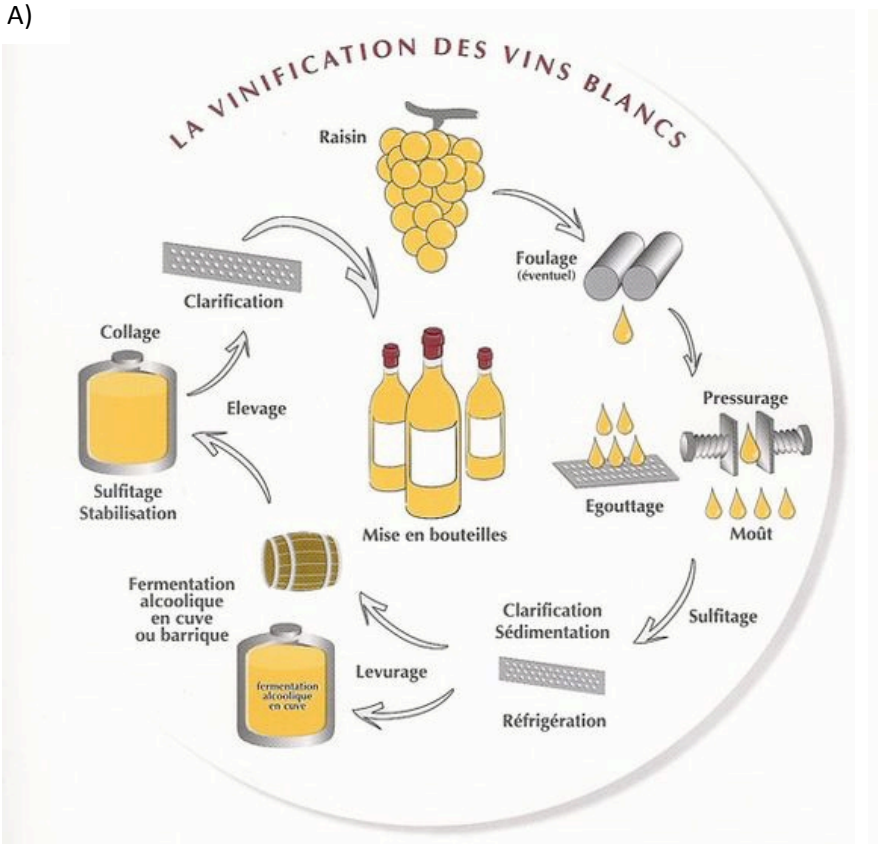
Ces composés phénoliques jouent des rôles essentiels dans les mécanismes physiologiques vitaux de la plante, comme la croissance, la reproduction ou la pigmentation, et ils participent à l'équilibre de la plante avec son environnement en ayant un rôle de protection contre les stress biotiques et abiotiques. Pour exemple, la principale fonction des stilbènes serait de protéger la plante contre les agresseurs, ce sont les phytoalexines de la vigne. Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques (Seppänen *et al.*, 2004). Le resvératrol est l'unité de base dont dérivent tous les autres stilbènes. Il réduit la croissance de champignons pathogéniques de la vigne, comme *Botrytis cinerea* (Adrian *et al.*, 1997) et *Phomopsis viticola* (Hoos & Blaich, 1990). Les flavonoïdes, quant à eux, participent notamment à la coloration des feuilles et des baies, ainsi qu'à leur protection aux UV et au stress oxydant. De plus, ces composés sont connus pour contribuer aux caractéristiques et à la qualité du vin, notamment à sa couleur, son astringence, son amertume, et ses arômes (McRae *et al.*, 2013).

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la consommation modérée de vin, dans le cadre d'un régime équilibré et un mode de vie sain, serait associée à des effets protecteurs vis à vis de plusieurs maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurodégénératives (Artero *et al.*, 2015; Mulero *et al.*, 2015). De tels effets pourraient être attribués aux propriétés biologiques des polyphénols, notamment à leurs activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Hussain *et al.*, 2016).

• **Les méthodes de vinification** varient en fonction des régions et des acteurs. Les itinéraires schématiques de vinification des vins rouges et blancs sont représentés sur la **Figure 15**.

La transformation contrôlée des moûts du 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) qui est assurée par la bactérie lactique *Oenonococcus oeni (O. oeni)*. L'impact de la FML correspond tout d'abord en une désacidification, donnant un vin plus équilibré avec une meilleure stabilité microbiologique. Le métabolisme des BL dans le vin a également une influence marquée sur le profil organoleptique du vin. L'impact se manifeste au travers de différents mécanismes : une élimination de composés aromatiques existants par le métabolisme et l'adsorption par les parois cellulaires; la production de nouvelles molécules *via* le métabolisme des sucres, acides aminés, polyols, lipides, et autres macro-molécules; le métabolisme et la modification des métabolites secondaires dérivés du raisin et des levures en produits finaux (Bartowsky & Henschke, 1995). Un exemple de contribution est la production de diacétyle par les bactéries œnologiques. La molécule caractérisée par un goût de beurre et de noisette est un intermédiaire dans le métabolisme de l'acide citrique chez *O. oeni*. Elle est produite avec l'α-acétolactate par décarboxylation du composé intermédiaire, le pyruvate. Pour ces raisons, la FML est considérée comme étant bénéfique à la qualité des vins élaborés dans les régions vinicoles froides, où le raisin contient naturellement des taux élevés d'acides organiques. La maîtrise de la réaction est recherchée dans presque tous les vins rouges et dans certains vins blancs. Elle est aussi appliquée pour certains cidres et champagnes (Lonvaud-Funel, 1999).

A)



B)

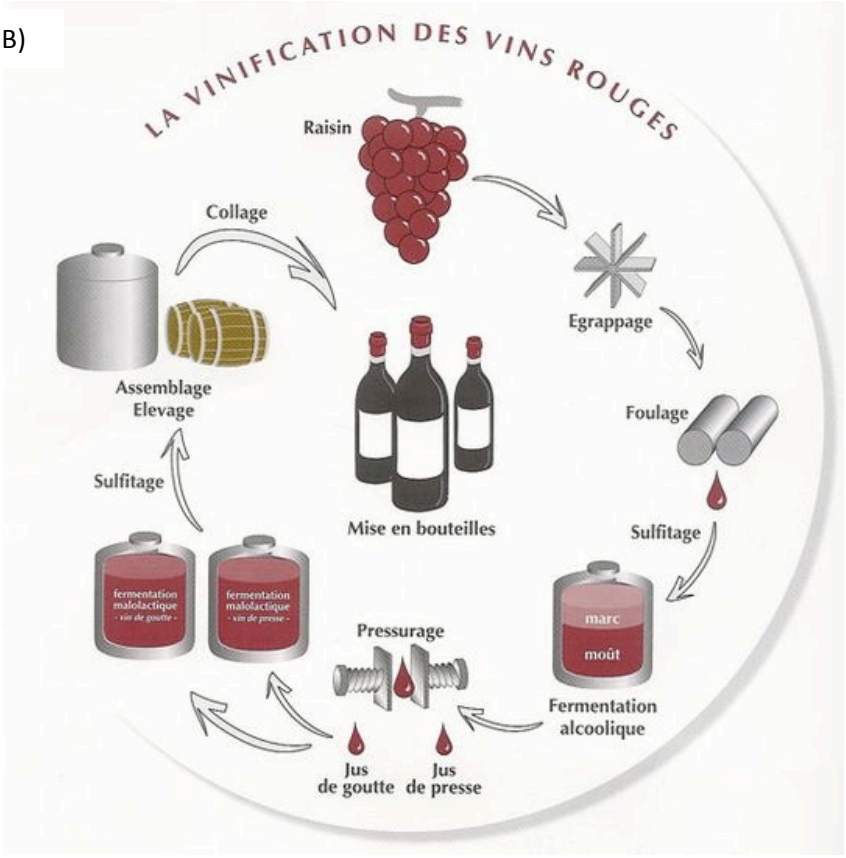


Figure 15. Schéma simplifié du procédé de vinification en vins blancs (A) et rouges (B). La fermentation alcoolique est commune aux deux types de vinifications, et peut être réalisée grâce à l'inoculation de souches commerciales sélectionnées ou de pied-de-cuve (moût sélectionné par le viticulteur pour multiplier les levures). Dans la région bordelaise, les vins blancs ne réalisent pas de FML.

L'origine bactérienne de la FML a été reconnue par les premiers microbiologistes du vin à la fin du 19ème siècle. L'une des premières descriptions est réalisée par Freiherr von Babo en 1837 qui décrit dans un ouvrage intitulé « *Short education on suitable treatments of vinified juices* » une seconde fermentation dans des vins jeunes, en corrélation avec la hausse des températures de fin de printemps. Pasteur en 1866 isole les premières bactéries œnologiques et entreprend des études sur le vin. Ses travaux présentent la FML comme une maladie du vin, et les bactéries du vin sont globalement associées à des flores d'altération. La baisse de l'acidité est à l'époque attribuée à la précipitation de l'acide tartrique. L'importance de la FML dans le procédé de vinification a ensuite été reconnue dans les principales régions françaises et à l'étranger, et il convient de citer les travaux pionniers de Müller-Thurgau (en 1891), Koch (1901), Müller-Thurgau et Osterwalder (en 1913) (Muñoz *et al.*, 2011). L'agent responsable de la FML est décrit et caractérisé en 1967, comme étant la bactérie lactique *Leuconostoc oenos.* L'espèce a ensuite été reclassifiée dans le nouveau genre *Oenococcus,* créant l'espèce *Oenococcus oeni* (Dicks *et al.*, 1995). La description fine des réactions biochimiques a été obtenue à partir des années 1970 grâce aux contributions de différents chercheurs dont notamment Kunkee (1997); Lonvaud-Funel et Saad (1982); Morenzoni (1974); et Salou *et al.* (1994). Leurs travaux ont démontré que la FML est liée à l'activité d'une seule enzyme, appelée enzyme malo-lactique, qui assure la conversion directe (décarboxylation) de l'acide L-malique dicarboxylique en acide L-malique monocarboxylique, et nécessite le NAD et l'ion Mn^{2+} comme co-facteur. Dans sa globalité, la réaction s'effectue en trois temps (**Figure 16)**. L'acide malique entre dans la cellule bactérienne. A un pH faible, la molécule non chargée pénètre par diffusion passive à travers la membrane. Un phénomène d''ionisation se produit lorsque le pH augmente. Dans le cytoplasme a alors lieu la réaction de décarboxylation, entrainant la formation de l'acide L-lactique et du CO_2, ce qui provoque une légère augmentation du pH intra-cellulaire. Les molécules d'acide L-lactique et de CO_2 sont ensuite expulsées de la cellule. Pour chaque molécule d'acide L-lactique exportée, un proton est également transporté. Il se créée ainsi un gradient de protons de part et d'autre de la membrane cellulaire. Le gradient, combiné à une ATPase fixée à la membrane, facilite la production d'ATP (la synthèse d'une molécule nécessite l'entrée de trois protons dans la cellule).

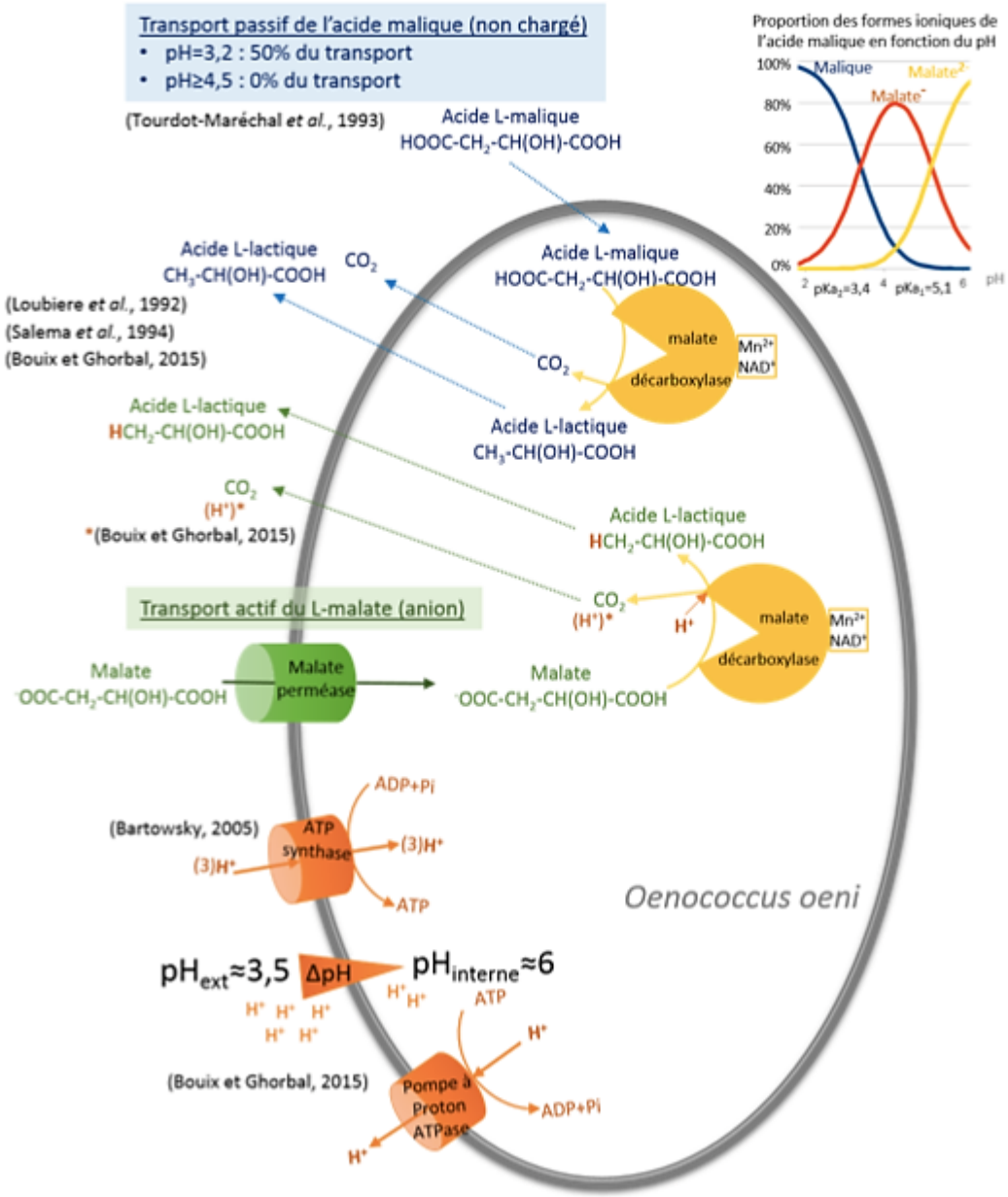


Figure 16. Transports de l'acide L-malique dans la cellule *de O. oeni* et rôle de la FML dans le maintien du pH interne (Bastard, 2015).

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.*, 2012).

Les flores présentes sont bénéfiques pour la plupart, et la participation de certaines flores indigènes aux fermentations améliore la complexité aromatique des vins.

Outre la présence d'*O. oeni*, d'autres 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 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 par les levures entraîne une augmentation de la teneur en éthanol, et la libération de différents produits issus de leur métabolisme. Ces composés inhibent la croissance des BL (King & Beelman, 1986; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988; Spano & Massa, 2006). 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 dans le 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.

1.2. L'espèce Oenococcus oeni

L'espèce *Œnococcus œni* a été définie en 1995 (Dicks *et al.*, 1995). Le genre *Oenococcus* s'est ensuite enrichi de l'espèce *O. kitaharae*, dont la souche type a été isolée à partir de shochu (alcool japonais à base de riz et de pomme de terre). Son ADN16S présente moins de 93% de similarité avec celui de *O. oeni* (Endo & Okada, 2006). L'espèce *O. alcoholitolerans* a été isolée d'un procédé de production de bioéthanol à partir de canne à sucre (Badotti *et al.*, 2014). Les pourcentages de similarité entre les gènes de l'ARNr 16S sont inférieurs à 94,76 % et 94,62 % par rapport aux espèces *O. kitaharae* et *O. oeni* respectivement.

Les niveaux de populations d'*O.oeni* sont généralement faibles lorsque les mesures sont réalisées par approches culturales (Lonvaud-Funel, 1999). Cependant, dans une étude récente, Franquès *et al.* (2017) mettent en évidence que l'espèce prédominante sur la baie de raisin est *L. plantarum* (48,4% des échantillons) suivie d'*O.oeni* (21%) lors de l'isolement de colonies sur milieu MRS. Les auteurs ont couplé leurs résultats avec une approche de séquençage par bar-coding, en amplifiant la région V4 du gène de l'ARNr 16S (Portillo *et al.*, 2016). Grâce à cette nouvelle approche, ils détectent la présence d'*O. oeni* dans 15 échantillons sur 16 testés, alors que *L. plantarum* n'est détecté que dans 9 échantillons (Franquès *et al.*, 2017). Les auteurs mettent ainsi en évidence l'existence de

population d'*O.oen*i sur la baie et qu'il est possible de détecter cette espèce dans des échantillons négatifs par l'approche culturale. Ces deux méthodes sont donc complémentaires, et les différences de résultats observées peuvent s'expliquer par une grande variabilité dans la vitesse de croissance des BL, ou la présence de cellules viables mais non cultivables (Millet & Lonvaud-Funel, 2000).

O. œni deviendra majoritaire dans le vin grâce à sa tolérance vis-à-vis des conditions difficiles qui s'installent progressivement dans le milieu. *O. oeni* est en effet hétéro-fermentaire, acidophile (avec un pH optimal de croissance aux environs de 4,8) et peut se développer en présence d'une teneur d'éthanol comprise entre 10 à 16 % (vol/vol) et à une température comprise entre 20 et 30 °C (Dicks *et al.*, 1995).

1.2.1. Diversité phénotypique

Bien qu'*O.oeni* soit particulièrement adaptée au vin, il existe une grande diversité au sein des souches, liée à leurs capacités à s'y développer et à mener la FML. Les souches montrent des performances variables : elles sont en effet plus ou moins résistantes aux pHs acides, aux teneurs élevées en éthanol, aux basses températures, ou encore à d'autres facteurs tels que la composition en polyphénols ou le dioxyde de soufre (SO_2) (Favier, 2012).

Le SO_2 peut être ajouté au moût ou au vin pour une meilleure stabilisation microbienne. Cet antioxydant peut également être produit par les levures en cours de FA, et ainsi inhiber la croissance des bactéries. Le dioxyde de soufre est présent sous 2 formes dans le vin : sa forme libre (SO_2 dissout ou HSO_3^-) qui est la forme active, et qui peut se combiner avec différentes molécules comme l'acétaldéhyde, les polyphénols, ou encore les sucres (Giménez-Gómez *et al.*, 2017). La forme libre est la plus toxique pour la cellule bactérienne, notamment lorsque sa concentration dépasse 15 mg/l (Guzzo *et al.*, 1998). La forme combinée affecte également les bactéries à partir de 30 mg/l. Ces dernières sont capables de métaboliser des molécules combinées au SO_2 et de libérer du SO_2 libre dans le milieu (Osborne *et al.*, 2006).

Des différences ont également été remarquées concernant leur composition en acides gras et leur capacité à assimiler certains d'entre eux (Guerrini *et al.*, 2003). La variabilité dans la capacité des souches *d'O.oeni* à synthétiser différents types de polysaccharides a également été montrée (Dimopoulou *et al.*, 2014). Enfin, les souches présentent des activités métaboliques variables, notamment une activité malolactique plus ou moins efficace (Cappello *et al.*, 2010; Favier, 2012).

1.2.2. Diversité génomique

A ce jour, un seul génome complet d'*O. oeni* est disponible dans les bases de données : celui de la souche PSU-1 (Mills *et al.*, 2005). Cependant, un ensemble de 203 génomes « draft » est accessible, grâce au séquençage de souches de France (CRBO), d'Australie (AWRI), d'Italie (OM), d'Argentine et du Chili. Le génome d'*O. oeni* a une taille moyenne de 1,8 Mb et un GC% de 37,9 (Mills *et al.,* 2005).

Absence des gènes mutS - mutL

O. oeni est une espèce supposée tachytélique, c'est-à-dire une espèce évoluant rapidement, et présente une distance génétique importante la séparant des *Leuconostoc* (Martinez-Murcia *et al.*, 1993). Cette hypothèse est soutenue par les analyses génomiques qui révèlent l'absence des gènes *mutS* et *mutL* chez *O. oeni* et *O. kitaharae* (Mills *et al.,* 2005, Marcobal *et al.*, 2008). Ces deux gènes sont impliqués dans le système de réparation des mutations de l'ADN (MisMatch Repair MMR). La protéine MutS cible les erreurs d'appariements au niveau de l'ADN et MutL se lie à MutS afin d'exciser les bases mal appariées. Ce système intervient dans la régulation du taux de mutation spontanée et de recombinaison inter-espèces, et son absence est un phénomène rare. L'absence de ces gènes est corrélée à un caractère hypermutable et une diversité génétique élevée, que ce soit chez *O. oeni* ou d'autres bactéries (Prunier & Leclercq, 2005 ; Marcobal *et al.,* 2008).

Structure de la population

L'analyse MLST (MultiLocus Sequence Typing) d'un grand nombre de génomes a permis d'étudier la distribution phylogénétique au sein de l'espèce. L'analyse d'une cinquantaine de souches a tout d'abord montré qu'elles se répartissent en 2 groupes A et B, et qu'il existe des sous-groupes corrélés à la matrice d'isolement, comme le champagne ou le cidre (Bilhère *et al.*, 2009). Une autre étude portant sur plus de 250 souches a confirmé l'existence des groupes A et B et suggéré l'existence d'un 3ème groupe nommé C (Bridier *et al.*, 2010), et montre qu'un sous-groupe de B contient exclusivement des souches isolées du cidre.

En 2015, les séquences génomiques d'une centaine de souches ont été utilisées pour enrichir l'arbre phylogénétique de l'espèce confirmant l'existence des groupes MLST A, B et C (Campbell-Sills *et al.*, 2015). L'arbre phylogénétique construit à partir des distances ANI (qui estiment l'identité nucléotidique moyenne entre les génomes entiers) a permis d'identifier des sous-groupes génétiques associés à des types de produits particuliers, comme le champagne et le cidre (**Figure 17**) (Campbell-

Sills *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent que l'espèce a été domestiquée pour se développer dans le vin. Récemment, Campbell-Sills *et al.* (2017) ont mis en évidence deux sous-groupes distincts de souches, isolées de vins de Bourgogne et appartement au groupe MLST A, associés à des vins rouges ou des vins blancs (**Figure 17C).**

Les conclusions de Sternes et Borneman (2016) sont similaires. L'analyse de 191 souches d'*O. oeni* décrit un pan-génome variable.

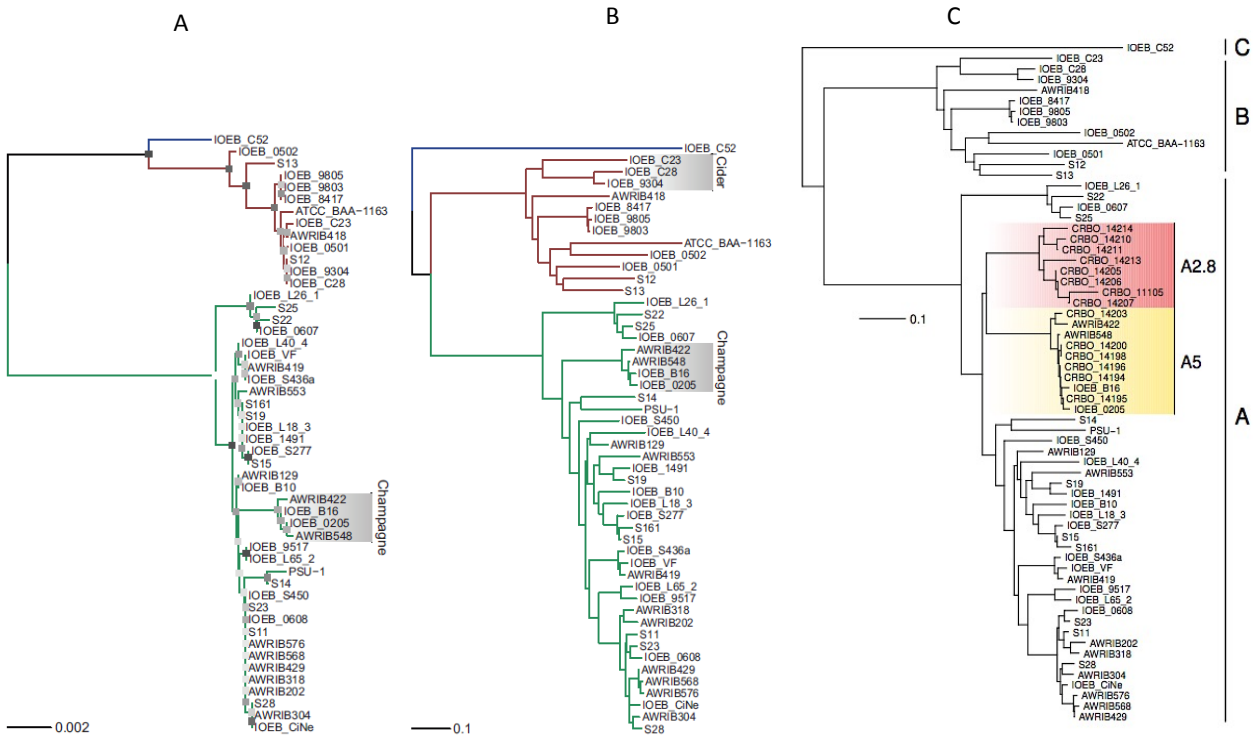


Figure 17. Arbres phylogénétiques de l'espèce *O. oeni* construits selon 2 méthodes différentes. Contruction par analyse MLST (A) et ANIm (B et C). Les groupes MLST sont indiqués en couleurs : A (en vert), B (en rouge) et C (en bleu). Les souches provenant du même produit (champagne, cidre) sont mises en évidence lorsqu'elles forment un même cluster (Campbell-Sills *et al* 2015, 2017)

Diversité des souches selon les régions géographiques.

Des études ont été menées pour rechercher s'il existe une distribution particulière des souches en fonction des régions géographiques ou des types de vins. La diversité des souches d'*O. oeni*, isolées à différentes étapes de la vinification dans différentes régions viticoles, a été évaluée au Portugal par des méthodes d'empreinte moléculaire (Marques *et al.*, 2011) ou en France par analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (El Khoury *et al.*, 2017). Les souches d'*O. oeni* ne semblent pas être spécifiques d'une région particulière, car les mêmes souches (ou des souches génétiquement proches) peuvent être retrouvées dans des régions éloignées (El Khoury *et al.*, 2017).

Une étude a tenté de déterminer si les microorganismes du raisin et du vin pouvaient être considérés comme une signature du terroir dans lequel ils évoluent. L'utilisation du séquençage systématique d'isolats issus de différents vignobles de Californie a permis de relier différents types de microorganismes avec les zones géographiques, le climat et les cépages, mettant ainsi en évidence la présence de « terroirs microbiens » (Bokulich *et al.*, 2014).

1.2.3. Du génotype au phénotype

L'apport de nombreuses séquences génomiques a permis de faire le lien avec des phénotypes particuliers, tels que la biosynthèse des acides aminés (Sternes & Borneman, 2016) ou le métabolisme des sucres.

Cibrario *et al.* (2016) ont montré qu'au sein d'un panel de 41 souches d'*O. oeni,* une quantité variable de sucres pouvait être consommée en fonction du groupe phylogénétique auquel elles appartiennent. Ainsi les souches du groupe A peuvent croître sur un minimum de 6 sucres tandis que les souches du groupe B utilisent un minimum de 10. Ces variations de phénotype ont pu être corrélées à l'absence ou inactivation de gènes codant pour des transporteurs, ou des enzymes de phosphorylation (phosphotransférases) ou d'hydrolyse.

La variabilité phénotypique des souches concerne également la synthèse d'EPS (exo-polysaccharides). Ces derniers contribuent à la formation de biofilms sur les surfaces abiotiques rencontrées dans les chais (Bastard *et al.*, 2016). Les biofilms confèrent un rôle protecteur vis-à-vis des conditions de stress, et les biofilms sont aptes à déclencher une FML. Les EPS constituent également un intérêt technologique lors de la production des levains industriels (Dimopoulou *et al.*, 2016). Les auteurs ont montré la présence de deux opérons de synthèse d'hétéropolysaccharides (EPS1 et EPS2) ainsi que des gènes isolés codant pour des glycosidases ou glycosyltransférases (*dsrO, dsrV, levO, gtf, it3, it4*). La recherche de corrélation entre la présence de ces opérons et le phénotype de production de polysaccharides a montré que l'absence de l'opéron EPS2 (ou la présence d'une forme tronquée) entraîne l'absence de polysaccharides capsulaires. L'implication de l'opéron EPS1 reste non élucidée.

2. Paramètres physico-chimiques du vin influençant la physiologie des micro-organismes et la FML

Les facteurs à l'origine d'une FML réussie les mieux compris sont le SO_2, le pH, l'alcool et la température (**Tableau V**). Un niveau favorable de l'un de ces paramètres, quel qu'il soit, peut compenser un niveau défavorable d'un ou plusieurs autres. Ces facteurs fonctionnent en effet en synergie, c'est-à-dire que leurs actions cumulées ont un effet total supérieur à la somme des actions individuelles.

Tableau V. Facteurs inflençant la FML (adapté de Betteridge *et al.,* 2015).

Inhibiteur	Commentaire	Conditions optimales	Conditions retrouvées dans le vin	Mécanisme d'inhibition	Références
Ethanol	Produit pendant la FA	Jusqu'à 5 % : stimule la croissance	12-15% (v/v)	Altère la structure et la fluidité membranaire	Da Silveira & Abee, 2009
pH	Acidité apporté par les baies de raisin et le viticulteur	4,8-5,5	2,5-3,5	Réduit la croissance et l'activité malolactique	Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999
Température	Les châteaux utilisent souvent la température ambiante pour la FML	25°C	12-20°C	Affecte le taux de croissance et augmente la phase de latence	Fugelsang, 1997
SO_2	Produit par les levures et ajouté pour prévenir les altérations pendant la vinification	0 mg/l	10-70 mg/l	Réduit l'activité ATPase et la viabilité cellulaire	Carreté *et al.*, 2002

Un certain nombre de facteurs moins connus, mais tout aussi importants, peuvent influencer le déroulement de la FML. Parmi eux, la concentration en composés phénoliques.

Chez les microorganismes non œnologiques, il a été rapporté que les polyphénols exercent une activité antimicrobienne et une action synergique avec les antibiotiques (Cushnie & Lamb, 2011). Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes ont souvent été étudiées. La concentration minimale inhibitrice est généralement faible pour ces composés, et inférieure à 100 µg/ml, comme c'est le cas chez *E. coli* ou *S. aureus* (Janssen *et al.*, 1987 ; Ríos & Recio, 2005). Parmi ces effets, un phénomène d'agrégation des cellules, causé par la présence de flavonoïdes, a été observé chez *S. aureus* (Cushnie *et al.*, 2007). Il est donc difficile de confirmer un effet antimicrobien lorsque le nombre d'UFC mesuré peut diminuer à cause de l'agrégation cellulaire (**Figure 18**).

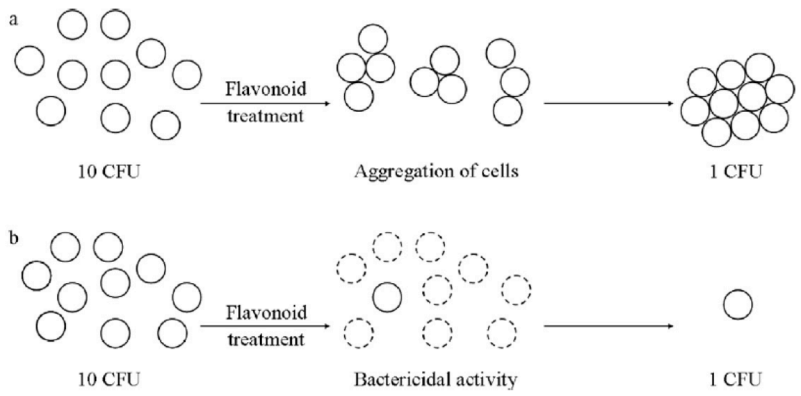


Figure 18. Deux mécanismes peuvent expliquer la réduction du nombre d'UFC mesurées : a. l'agrégation des cellules en présence de flavonoïdes, b. l'activité bactéricide de la molécule (Cushnie *et al.,* 2011).

Les effets des composés phénoliques ont également été étudiés chez les BL d'intérêt technologique telles que *L. plantarum* ou *O. oeni* (Rodríguez *et al.*, 2009). Des exemples des différents effets entraînés par la présence de composés phénoliques sur les BL sont proposés **Tableau VI.**

Certains composés phénoliques, tels que les acides *p*-courmarique, férulique, caféique, gallique, ou la catéchine, peuvent avoir un effet positif et stimuler la croissance d'*O. oeni* à faible concentration (50 µg /ml) en présence de 6% d'éthanol (Rozès *et al.*, 2003).

Tableau VI. Impact des composés phénoliques sur les BL

Groupe de composés phénoliques	Composé	Nature de l'impact	Référence
Acides phénoliques	Acide gallique	Stimulation de la croissance d'*O. oeni* et de l'activité malolactique	Lombardi *et al*., 2012; Reguant *et al.*, 2000; Vivas *et al.*, 1997,
Acides hydroxycinnamiques	Acide *p*-coumarique, caféique, ou férulique	Effet neutre ou inhibiteur sur *L. hilgardii*, *P. pentosaceus*, *O. oeni*. La croissance est plus affectée que l'acivité malolactique	Reguant *et al.*, 2000, Campos *et al.*, 2003
Flavonoïdes	Anthocyanines libres	Activation de la croissance cellulaire et du taux de dégradation de l'acide malique	Vivas *et al.*, 1997
	Quercétine	Inhibition ou stimulation de la croissance bactérienne et de la FML Agrégation des cellules de *S. aureus*	Cushnie & Lamb 2011, Reguant *et al.*, 2000, Cushnie *et al.*, 2007, Hirai *et al.*, 2010
	Kaempférol	Fort effet inhibiteur dépendant de la dose sur la croissance bactérienne	Cushnie & Lamb 2011
	Catéchine + épicatéchine (dans des concentrations normales de 10 à 200 mg/l de vin)	Stimulation de la croissance *d'O. oeni*.	Cushnie & Lamb 2011, Lombardi *et al.*, 2012
	Tanins, en particulier tétramères et pentamères	Affectent fortement la viabilité cellulaire. Toxiques à faibles concentrations (inférieures aux concentrations courantes de 0,5 mg/l de vin)	Figueiredo *et al*., 2008, Vivas *et al.*, 2000.

Les mécanismes d'action des composés phénoliques sur la physiologie d'*O. oeni* sont cependant mal connus (Chasseriaud *et al.*, 2015). Il a été montré qu'*O. oeni*, par l'action de glycosidases, β-glucosidases, estérases, décarboxylases, est capable de métaboliser les anthocyanes et autres composés phénoliques importants pour la production d'arômes (Cappello *et al.*, 2017). Il existe cependant une grande variabilité dans l'activité de ces enzymes selon les souches étudiées (Grimaldi *et al.*, 2005)

3. Les échecs de FML et le développement de levains FML

Les FML peuvent être réalisées de façon spontanée grâce au microbiote indigène du raisin et du chai. Cette étape du processus de vinification est toutefois souvent perçue comme capricieuse par les professionnels. Le non déclenchement, le ralentissement voire l'arrêt de la FML sont redoutés, entraînant un risque accru de développement de flores autochtones productrices d'éventuelles molécules indésirables, dépréciatrices de la qualité du produit final. L'explication majeure de ces échecs réside dans l'insuffisance de la biomasse bactérienne indigène, provoquée par les conditions physico-chimiques difficiles du milieu. Des solutions visant à assurer rapidement la FML ont été développées en conséquence.

Un levain malolactique est une souche bactérienne isolée d'un vin en cours de FML spontanée, sélectionnée en laboratoire pour ses propriétés technologiques et sa résistance aux conditions extrêmes rencontrées dans le vin (**Tableau VII**). Elle est ensuite produite et utilisée en quantité suffisante pour assurer le déclenchement et la dégradation rapide de l'acide L-malique présent dans le vin.

Tableau VII. Critères de sélections de levains FML (d'après Torriani *et al.*, 2011)

Catégories	Propriétés
Résistance aux stress	Résistance aux forts taux d'éthanol (14% v/v)
	Tolérance à pH 3,0
	Résistance aux fortes concentrations de SO_2 et aux basses températures
	Résistance aux bactériophages
Performances technologiques	Haute activité malolactique
	Capacité à mener la FML dans différents types de vins
	Croissance en milieu synthétique
	Production de composés recherchés ou augmentant l'arôme fruité
	Faible production d'acide acétique au pH du moût et du vin
	Absence de production de polysaccharides filants
	Absence de production de composés indésirables
	Compatibilité avec la levure utilisée en FA
	Capacité à être lyophilisée et congelée
Sécurité	Absence de production d'amines biogènes et de carbamate d'éthyle
	Incapacité à transmettre des gènes de résistance aux antibiotiques

Des stratégies de sélections complémentaires sont aujourd'hui proposées. L'identification de voies métaboliques de synthèse de certains composés indésirables (amines biogènes, polysaccharides filants) a permis le développement d'outils PCR ciblant les gènes impliqués et permettent d'écarter rapidement les souches porteuses lors de la sélection (Coton *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, plus de 40 levains malolactiques sont commercialisés. La grande majorité contient une unique souche d'*O. oeni*, parfois un Lactobacille ou un mélange de souches (Torriani *et al.*, 2010, Toit *et al.*, 2011). Les levains malolactiques sont proposés principalement sous forme lyophilisée, parfois sous forme congelée et sont préconisés pour une inoculation directe dans le vin ou après une phase d'acclimatation. Ils peuvent être utilisés en co-inoculation avec les levures au cours de la FA ou en inoculation séquentielle, après la FA. Le taux d'inoculation correspond généralement à 10^6-10^7 cellules/ml de vin.

La maîtrise des fermentations peut également mettre en œuvre des souches indigènes sélectionnées (Garofalo *et al.*, 2015), ainsi que l'inoculation de pied-de-cuves. De nouveaux levains FML à base de souches de *Lb. plantarum* sont aujourd'hui commercialisés (Lallemand, CHR Hansen). L'espèce est homofermentaire, et présente des propriétés technologiques intéressantes en limitant l'apport d'acidité volatile (Sun *et al.*, 2016, Berbegal *et al.*, 2016).

4. Le phage acteur de l'environnement œnologique

4.1. Sources et isolement de phages infectant O. oeni (oenophages)

La présence de phages dans l'écosystème complexe associé à la vinification est décrite pour la première fois à partir d'échantillons de vin collectés en Suisse. Ces travaux pionniers rendent compte de l'isolement de phages infectant l'espèce responsable de la FML, *O. oeni* (Sozzi *et al.*, 1976). Les études sont rapidement confortées par l'isolement d'oenophages à partir de vins australiens (Davis *et al.*, 1985), américains (Henick-Kling *et al.*, 1986a), sud-africains (Nel *et al.*, 1987), allemands (Arendt & Hammes, 1992), et français (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Les phages isolés proviennent d'échantillons prélevés ponctuellement à l'étape de la FML, et sont associés à des cépages variés (**Tableau VIII**). Les travaux de Sozzi portent sur des vins blancs, et les autres équipes se concentrent sur des vinifications en rouge. Une seule étude élargit la recherche à des échantillons de moûts, de raisins, et de feuilles de vigne (Nel *et al.*, 1987) mais elle se révèle infructueuse. Toutefois elle permet d'isoler des oenophages à partir de sucre de canne. Il est intéressant de noter que plus de 25 ans plus

tard, la nouvelle espèce *O. alcoholitolerans* sera isolée de cette même matrice (Badotti *et al.*, 2014). Les différentes surfaces abiotiques offertes dans les chais ne sont pas analysées et leur rôle possible de réservoir de phages n'est pas exploré.

Tableau VIII. Echantillons oenologiques contenant des bactériophages libres

Origine des échantillons testés	Ech. positifs[a]	Référence	Pays/université
Vins suisses en FML	nd	Sozzi *et al.*, 1976	Station de Changins, Nyon, CH
Quatre vins suisses, millésime 1981, cépages Chasselas, Gamay, Sylvaner, inoculés par levains FML[b]	4/4	Sozzi *et al.*, 1982	Nestlé et Station de Changins, Nyon, CH
Huit vins suisses, millésime 1981, cépages Chasselas, Gamay et Pinot, 8 caves (A à G), inoculés par levains FML [b]	4/8	Cazelles & Gnaegi, 1982	Station de Changins, Nyon, CH
Trente vins de Suisse romande, millésime 1981, cépage Chasselas, issus de 4 caves (A à G) inoculés par levains FML [b]	16/30 issus de 4 caves distinctes	Gnaegi & Sozzi, 1982	Nestlé et Station de Changins, Nyon, CH
Vins de Suisse romande, millésime 1982, cépage Chasselas, 4 caves (H à K), inoculés par levains FML [b]	27 vins de 8 caves distinctes	Gnaegi *et al.*, 1984	Nestlé et Station de Changins, Nyon, CH
Vins rouges, millésime 1984, Yenda, New South Wales (AU)	4/16	Davis *et al.*, 1985	U. of New South Wales, AU
Vin rouge, millésime 1984, cépages Cabernet Sauvignon et Shiraz, inoculation par levains FML	1/1	Henick-Kling *et al.*, 1986a	AWRI and U. Adelaide, Glen Osmond, AU
Vins [b]; moûts ; raisins frais ; peau de raisin ; feuilles de vigne ; sucre de canne ; eaux d'effluents	Vins à FML retardée ; sucre de canne	Nel *et al.*, 1987	U. Stellenbosch, ZA
Vins allemands [b], millésime 1990; fruits écrasés	34 vins/34	Arendt & Hammes, 1992	U. Hohenheim, Stuttgart, DE
Vins rouges, millésime 2008, Médoc, Pauillac, Bordeaux, France	20/22	Jaomanjaka *et al.*, 2013	ISVV, Villenave d'Ornon, F

[a] Observation en MET et/ou mise en évidence de plages de lyse sur un hôte sensible ; [b] vins à FML retardée

Les premiers travaux consistent en une observation des échantillons de vins en MET. Les échantillons sont observés tels quels (Arendt & Hammes, 1992) ou bien sont au préalable débarrassés des débris par centrifugation, puis soumis à ultracentrifugation (Cazelles & Gnaegi, 1982; Sozzi *et al.*, 1982). L'observation de particules est fréquente dans les vins testés. Cependant elle ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agit bien d'oenophages, ni de statuer sur leur activité infectieuse. Ces deux caractéristiques sont renseignées dans les études ultérieures, qui se basent sur la technique de la double-couche (Adams, 1959). Pour ce faire, les échantillons de vin sont filtrés (Arendt & Hammes, 1992 ; Davis *et al.*, 1985), ou subissent un enrichissement par incubation en bouillon MRS 24 à 48 heures (Nel *et al.*, 1987). La présence de phages se traduit par la formation de plages de lyse sur une souche hôte. Le succès de l'approche dépend donc de la présence d'au moins une souche sensible dans le panel de souches testées, qui doit être le plus large et diversifié possible. Selon les études, les souches correspondent à des souches de laboratoire, à des levains commerciaux (lorsque le vin a été inoculé), ou bien à des souches locales, c'est à dire isolées du vin (source du phage).

Rapidement, une autre source non négligeable d'oenophages est identifiée, et correspond aux souches bactériennes, qui sont susceptibles d'abriter des prophages dans leur génome. L'hypothèse

est proposée par Lee *et al.* (1978) qui décrit la lysogénie chez les BL du vin affiliées aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Les expériences d'induction menées dans l'espèce *O. oeni* utilisent la MC (MC) (concentrations finales 0,3 à 10 µg/ml) (**Tableau IX**). Le test est considéré positif dès lors qu'une lyse est observée dans la culture traitée par rapport au témoin sans MC (Arendt *et al.*, 1990, 1991; Doria *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 1996; Poblet-Icart *et al.*, 1998; Tenreiro *et al.*, 1993). Les auteurs complètent l'analyse et vérifient que les surnageants de culture traitée à la MC (i) forment des plages de lyse sur une souche sensible (dérivée curée de la souche traitée/souche de collection) et (ii) sont incapables d'infecter la souche lysogène de départ, la résistance étant inhérente au mécanisme d'immunité à la surinfection (Arendt & Hammes, 1992; Boizet *et al.*, 1992 ; Tenreiro *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996). Il y a globalement une bonne correspondance entre le pourcentage de lyse et le pourcentage de surnageants aptes à former des plages. Quelques exceptions sont notées, comme l'étude de Tenreiro *et al.* (1993) où les auteurs observent l'absence de lyse dans certaines souches, alors même que le surnageant produit bien des plages de lyse sur un hôte.

D'autres auteurs observent au contraire un phénomène de lyse sans présence concomitante de phages. Arendt *et al.* (1991) suggèrent l'existence d'une certaine hétérogénéité de sensibilité à la MC dans l'espèce. L'induction des prophages chez *O. oeni* est également observée après irradiation UV (Doria *et al.*, 2013) et ces auteurs rapportent que son efficacité est supérieure à celle de la MC (**Tableau IX**).

Tableau IX. Lysogénie chez *O. oeni* et modalités d'induction des souches

Conditions d'induction		Nbre de souches testées	Lyse (nbre et %)	Lysats formant plages		Référence et pays
MC (µg/ml)	UV			Nbre de souches hôtes potentielles testées	Lysats positifs	
0,3	-	1	1/1	39	1	Arendt *et al.*, 1990 ; DE
0,3 à 1	-	30	19/30 (63%)	4	17/30 ; 56%	Arendt *et al.*, 1991 ; DE
1	-	3	2/3	3 (dérivés curés)	-	Cavin *et al.*, 1991 ; F
10	-	29	6/29 (21%)	29	19/29 ; 66%	Tenreiro *et al.*, 1993 ; PT
0.01 à 1	-	105	35/105 (33%)	105	46%	Huang *et al.*, 1996 ; NZ
1	-	67	45	32	Au moins 18/40	Poblet-Icart *et al.*, 1998 ; F
1	-	37	8/37	-	-	Doria *et al.*, 2013 ; IT
-	UV	37	15/37	-	-	Doria *et al.*, 2013 ; IT

Les données d'induction disponibles dans la littérature sont cohérentes, et montrent que la lysogénie est prévalente au sein de l'espèce *O. oeni*, avec un taux de lysogénie estimé à 46 % (Huang *et al.*, 1996), 56% (Arendt *et al.*, 1991) et 66 % (Tenreiro *et al.*, 1993). La prévalence sera confirmée à partir de 2005 *via* l'exploration des génomes, au travers de la réalisation de cartes génomiques par électrophorèse en champs pulsés (Zé-Zé *et al.*, 1998), d'approches d'hybridation soustractive (Bon *et al.*, 2009), puis grâce à l'essor des approches de séquençage à haut débit initiées en Australie et à Bordeaux, et de la génomique comparative qui en découle (Guzzo *et al.*, non publié ; Borneman *et al.*, 2010). Cette entrée dans l'ère de la génomique comparative chez *O. oeni* permet de corréler la

plupart des polymorphismes observés dans les génomes à la présence d'éléments mobiles (séquences d'insertion ou prophages) (Zé-Zé *et al.*, 2008; Bon *et al.*, 2009; Borneman *et al.*, 2010). L'approche *in silico* confirme les travaux d'induction précédents et deux études rapportent des taux de 64% (panel de 14 souches) (Borneman *et al.*, 2010) et 58% (panel de 29 souches) (Jaomanjaka, 2014). Les valeurs restent proches selon les deux approches (induction/bioinformatique) alors même que l'approche *in-silico* présente l'avantage de pouvoir identifier et éliminer les souches identiques éventuellement présentes dans le panel.

4.2. *La lysogénie et les bases de la recombinaison site-spécifique chez* O. oeni

Au cours de la phase d'isolement de phages, les plages observées sur les tapis bactériens sont troubles, ce qui est l'une des caractéristiques des phages tempérés. Toutefois, Arendt *et al.* (1990) décrivent un cas de « carrier state » où le génome phagique est présent à l'état libre dans le cytoplasme, et est perdu par repiquages successifs de la souche en conditions de laboratoire. Pour la majorité des autres oenophages décrits, l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome bactérien est confirmée par hybridations puis *in silico*. Santos *et al.* (1996) mettent en évidence l'existence de deux sites distincts dans le génome de la souche PSU-1, dans lesquels deux phages différents peuvent s'intégrer, et Borneman *et al.* (2010) décrivent la présence de deux prophages insérés en tandem dans le même site. La recombinaison site-spécifique (RSS) est décrite chez les phages Φ10MC (Gindreau *et al.*, 1997), fOg30, fOg44, et fOgPSU1 (Parreira *et al.*, 1999; São-José *et al.*, 2004). Les séquences des sites *attP* (phagique), *attD*, *attL* et *attB* (présents sur le chromosome des souches lysogénisées, et curées/non infectées, respectivement) sont localisées, et leur séquence déterminée. Les phages fOg44, Φ10MC et fOgPSU1 s'intègrent à l'extrémité 3' d'un tRNA ($tRNA^{Glu}$, $tRNA^{Leu}$ et $tRNA^{Lys}$, respectivement). Les homologies entre les sites *attB* et *attP* sont estimées à 17 pb, 15 pb et 20 pb, respectivement (**Figure 19**).

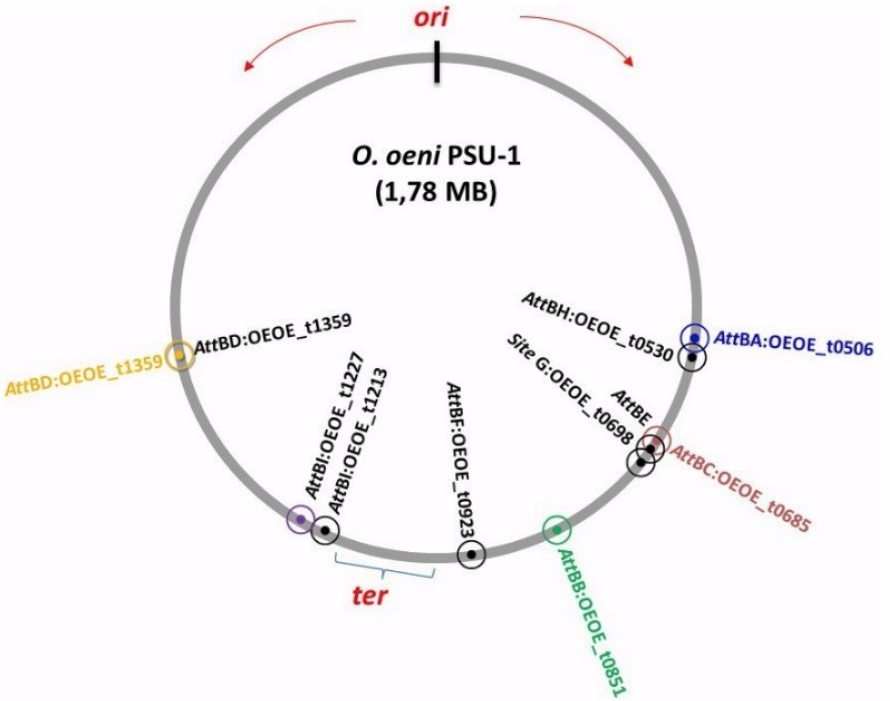


Figure 19. Sites *attB* potentiels utilisés par les prophages et différents remnants chez l'espèce *O. oeni.* Chaque site est nommé de A à I. Le génome de la souche PSU-1 est utilisé comme référence et les numéros de gènes correspondant sont indiqués (d'après Jaomanjaka, 2014).

Les recherches bio-informatiques menées ultérieurement par Borneman *et al.* (2010) et Jaomanjaka (2013) confirment l'existence de ces trois sites dans le chromosome bactérien, tous situés sur le réplicore droit. Un quatrième site ($tRNA^{Leu}$) est localisé sur le réplicore gauche, et sa taille (140 pb) est significativement plus grande que celles observées précédemment. Les quatre sites d'insertion des prophages sont renommés $attB_A$ à $attB_D$ par Jaomanjaka *et al.* (2013). Ces mêmes auteurs localisent par ailleurs d'autres ilôts phagiques défectifs insérés au site D, ou au niveau de quatre sites distincts, nommés E, F, H et I, correspondant également à des gènes *tRNA* (**Figure 20).**

Les intégrases virales associées aux génomes appartiennent sans exception à la famille des intégrases à tyrosine. La comparaison de leur séquence protéique montre une répartition en quatre clusters, chacun étant corrélé à l'un des quatre sites d'intégration A à D décrits (Jaomanjaka *et al.*, 2013, 2016). L'approche bioinformatique est en faveur d'un tropisme marqué de la RSS dans l'espèce, et les prophages A, B, C et D ne s'intègrent pas au niveau de sites d'attachement secondaires.

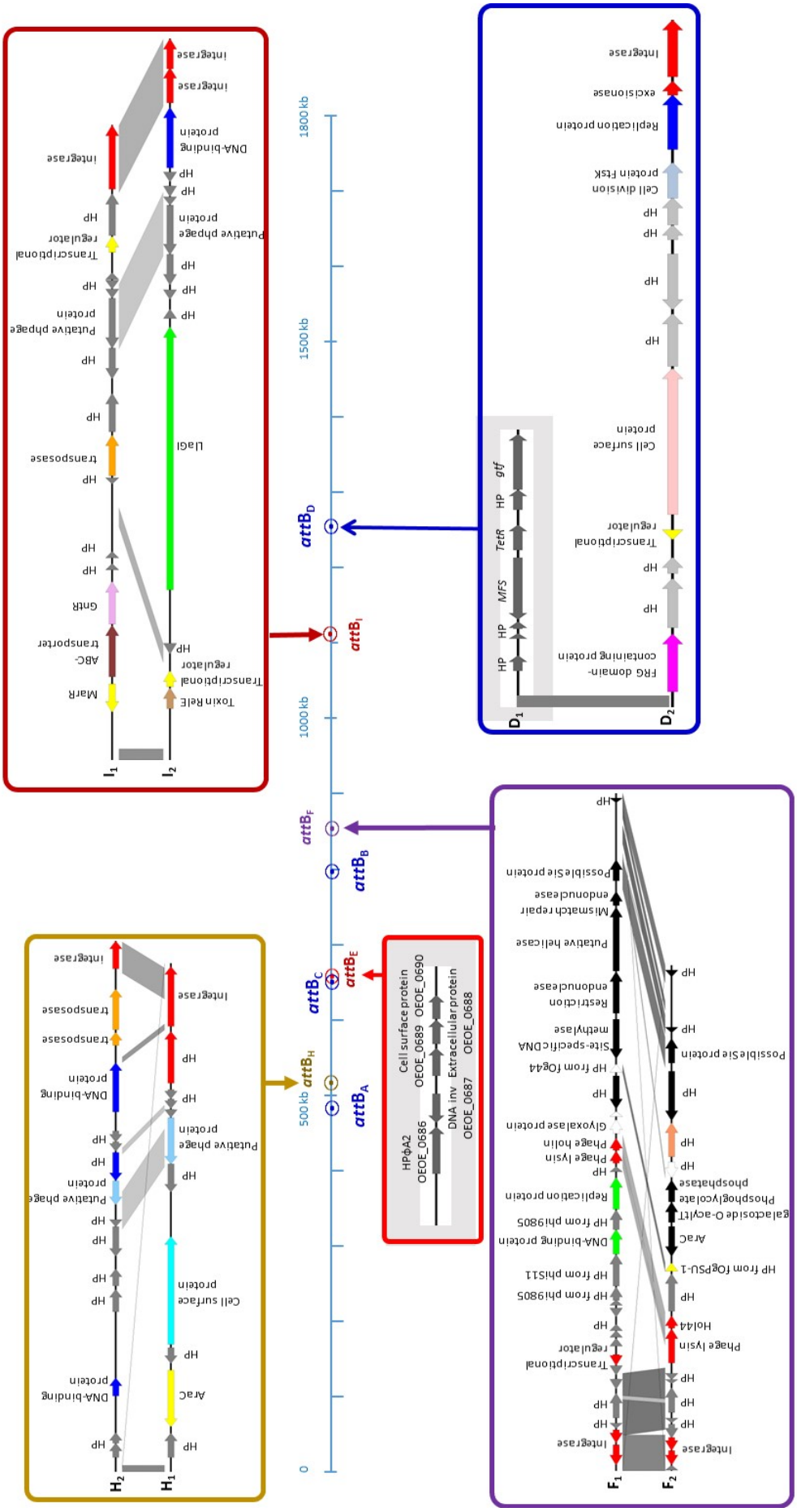


Figure 20. Localisation des séquences prophagiques sur le chromosome d'*O. oeni*. d'après Jaomanjaka (2014).

En combinant l'approche bioinformatique avec des expériences d'induction des souches lysogènes, Jaomanjaka (2014) montre que les prophages détectés aux sites A, B et D chez 29 souches forment des particules infectieuses en culture après induction à la MC, et sont donc bien actifs. Seuls deux prophages semblent défectifs et appartiennent aux groupes A (souche IOEB 0502) et B (souche IOEB C23). Le caractère défectif semble plus général au sein des prophages de type C. Leur génome contient pourtant *a priori* toutes les fonctions requises et l'analyse de la séquence protéique de leur intégrase est *a priori* compatible avec une activité de type recombinase. Jaomanjaka (2014) et (Borneman *et al.*, 2010) observent également que les prophages de type C sont systématiquement associés à la présence d'un second prophage, de type A ou D. Lorsque les souches doublement lysogènes sont induites à la MC, aucune plage contenant uniquement le phage C n'est identifiée, alors que c'est le cas pour le prophage A ou D co-résident. Jaomanjaka *et al.* (2013) proposent que les phages C ne peuvent pas mener leur cycle infectieux seuls, et dépendent de composants du second phage « helper ». Cette situation entraîne un risque de curage progressif et de perte du prophage C dans la population. L'hypothèse apparaît compatible avec le faible taux de présence de prophages C observé dans les génomes complets de *O. oeni* (3 sur 50), analysés par Fety Jaomanjaka (2014). De même, une campagne d'isolement de 17 phages à partir de vins rouges confirme l'absence de phage C pur (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Enfin, ces mêmes auteurs notent que l'induction de prophages de type B et D peut mener à l'apparition de quelques plages claires, correspondant à de phages ayant perdu l'aptitude à lysogéniser leur hôte bactérien.

4.3. Premières caractérisations d'oenophages

Les travaux menés dans les années 1980-1990 qui ont précédé l'essor de la génomique comparative ont permis de développer les aspects techniques nécessaires à la multiplication des phages et à la production des lysats concentrés. Ils ont aussi progressivement livré les premières caractéristiques des oenophages (**Tableau X**).

Si l'on compare les observations en MET réalisées entre 1982 et 2017, les particules, qu'elles proviennent de l'hémisphère nord ou sud, montrent toutes une même morphologie, typique de la famille des *Siphoviridae*. Les tailles des particules et de leurs composants présentent une gamme de taille allant de 34 à 75 nm pour la tête, et 160 à 308 nm pour la queue (**Tableau X**). Deux originalités morphologiques sont toutefois rapportées par Sozzi et collaborateurs, qui observent sur un même champ une particule de type *Podoviridae*, ainsi qu'un siphophage présentant une partie ondulée à l'extrémité de la partie caudale (Sozzi *et al.*, 1982). Cependant ce cliché a été obtenu à partir de l'observation directe d'un vin, et l'aptitude de ces phages à infecter *O. oeni* n'a donc pas été

démontrée. Il peut s'agir d'un nouveau type d'oenophage, qui serait alors minoritairement présent dans l'environnement oenologique, mais l'éventualité qu'il s'agisse de particules phagiques infectant d'autres bactéries du vin doit également être considérée.

Tableau X. Observations en MET des phages isolés à partir de l'environnement œnologique

Echantillon			Hôte *O. oeni* démontré [a]	*Caudovirales*	Taille (nm)		Références
Vin	Phage purifié				Tête	Queue	
	nom	origine					
GV2 Chas	-	-	non	*Siphoviridae*	-	-	Sozzi *et al.*, 1982
530 Gam	-	-	non	*Siphoviridae*	-	-	Sozzi *et al.*, 1982
512 Chas	-	-	non	*Podoviridae-like* + *Siphoviridae*	-	-	Sozzi *et al.*, 1982
	58	vin	oui	*Siphoviridae*	-	-	Davis *et al.*, 1985
	84	vin	oui	*Siphoviridae*	-	-	Davis *et al.*, 1985
	449	vin	oui	*Siphoviridae*	-	-	Davis *et al.*, 1985
	452	vin	oui	*Siphoviridae*	-	-	Davis *et al.*, 1985
	L1(Ia7)	sucre de canne	oui	*Siphoviridae*	-	-	Nel *et al.*, 1987
	L8 (1890)	sucre de canne	oui	*Siphoviridae*	-	-	Nel *et al.*, 1987
	S1.1s	vin australien rouge	oui	*Siphoviridae*	42-45	192-207	Henick-Kling *et al.*, 1986b
	ΦLco23	vin suisse (Sozzi *et al.*, 1982)	oui	*Siphoviridae*	50-56	246-260	Henick-Kling *et al.*, 1986b
					57 ± 2	250 ± 20	Arendt & Hammes, 1992
	Φ1002	Induction MC 1002	oui	*Siphoviridae*	52 ± 3	210 ± 10	Arendt & Hammes, 1992
	P58l	Surnageant de culture [b]	oui	*Siphoviridae*	54	243	Arendt *et al.*, 1990
	P37	Induction MC Lo37	oui	*Siphoviridae*	53 ± 2	183 ± 20	Arendt *et al.*, 1991
	P32	Induction MC Lo32	oui	*Siphoviridae*	53 ± 2	179 ± 15	Arendt *et al.*, 1991
	P54	Induction MC Lo54	oui	*Siphoviridae*	54 ± 3	221 ± 6	Arendt *et al.*, 1991
	PAt5-12	Induction MC	oui	*Siphoviridae*	54 ± 3	257 ± 8	Arendt *et al.*, 1991
	PZt11-15	Induction MC	oui	*Siphoviridae*	58 ± 3	263 ± 10	Arendt *et al.*, 1991
	Lo27a	vin suisse (Sozzi *et al.*, 1982)	oui	*Siphoviridae*	60	185	Boizet *et al.*, 1992
	Lo22a	vin suisse (Sozzi *et al.*, 1982)	oui	*Siphoviridae*	60	260	Boizet *et al.*, 1992
	Lo27b	vin suisse (Sozzi *et al.*, 1982)	oui	*Siphoviridae*	60	185	Boizet *et al.*, 1992
	LTH 24P	Vin Müller-Thurgau	oui	*Siphoviridae*	64 ± 3,5	299 ± 8	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 25P	Vin Trollinger	oui	*Siphoviridae*	69 ± 2	282 ± 20	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 26P	Vin Trollinger	oui	*Siphoviridae*	74 ± 4	278 ± 15	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 27P	vin Spätburgunder	oui	*Siphoviridae*	72 ± 3	266 ± 20	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 28P	Vin Spätburgunder	oui	*Siphoviridae*	68 ± 1	314 ± 8	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 29P	vin schwarzriesling	oui	*Siphoviridae*	70 ± 2,5	282 ± 12	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 30P	vin schwarzriesling	oui	*Siphoviridae*	74 ± 2	287 ± 13	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 31P	vin schwarzriesling	oui	*Siphoviridae*	66 ± 4	305 ± 10	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 32P	Vin schwarzriesling	oui	*Siphoviridae*	55 ± 5	308 ± 10	Arendt & Hammes, 1992
	LTH 33P	Vin schwarzriesling	oui	*Siphoviridae*	75 ± 5	303 ± 20	Arendt & Hammes, 1992
Ries/Syl [c]			non	*Siphoviridae*	75	303	Arendt & Hammes, 1992
	fog29	Induction MC bOg29	oui	*Siphoviridae*	36-42	243-261	Santos *et al.*, 1996
	fog30	Induction MC bOg30	oui	*Siphoviridae*	49	234-249	Santos *et al.*, 1996
	fog44	Induction MC bOg44	oui	*Siphoviridae*	46-49	221-242	Santos *et al.*, 1996
	fogML34	Induction MC ML34	oui	*Siphoviridae*	33	247-274	Santos *et al.*, 1996
	fog4029	Induction MCL4029 [c]	oui	*Siphoviridae*	50	233-264	Santos *et al.*, 1996
	fogPSU1	Induction MC PSU1	oui	*Siphoviridae*	34-43	228-243	Santos *et al.*, 1996
	POF025	Induction MC LOD025	oui	*Siphoviridae*	60-66	220	Poblet-Icart *et al.*, 1998
	OE33PA	Vin rouge, Pauillac, F	oui	*Siphoviridae*	63 ± 3	272 ± 4	Jaomanjaka *et al.*, 2016
	foe25	Induction MC OE25	oui	*Siphoviridae*	55	200	Costantini *et al.*, 2017
	foe33	Induction MC OE33	oui	*Siphoviridae*	60	260	Costantini *et al.*, 2017
	foe3	Induction MC OE3	oui	*Siphoviridae*	60	160	Costantini *et al.*, 2017
	foe20	Induction MC OE20	oui	*Siphoviridae*	47	220	Costantini *et al.*, 2017

[a] le phage forme des plages de lyse sur un hôte affilié à l'espèce *O. oeni* ; [b] phage carrier state ; [b] CECT, Coleccion Espanola de Cultivos Tipos ; [c] le vin contient le phage LTH 34P, pour lequel aucun hôte n'a été identifié.

Chas., Chasselas ; Gam., Gamay ; Ries, Riesling ; Sylv, Sylvaner.

Malgré une morphologie identique au sein des oenophages décrits, l'analyse des protéines structurales révèle une diversité importante (**Tableau XI**) également reflétée par les résultats de l'analyse des génomes. Avant 2005, les analyses consistent en des digestions par enzymes de restriction, qui montrent que tous les ADNs possèdent des sites pour les enzymes *Eco*RI, *Eco*RV, *Hin*fI et *Bam*HI.

Tableau XI Autres caractéristiques des oenophages

Nom	Cycle	Spectre		Burst-size	Génome		Protéines de capside (kDa)[a]	Références
		O. oeni	Autres BL		taille	cos		
58	T	42/101	Négatif [b]	nd	nd	nd	nd	Davis *et al.*, 1985
84	T	43/103	Négatif [b]	nd	nd	nd	nd	Davis *et al.*, 1985
449	T	38/100	Négatif [b]	nd	nd	nd	nd	Davis *et al.*, 1985
452	T	41/102	Négatif [b]	nd	nd	nd	nd	Davis *et al.*, 1985
Φ1002	T	52/112	Négatif [c]	25	36	oui	40; 30; 14	Huang *et al.*, 1996
fOg29	T	6/14	Négatif [d]	nd	39,9	oui	nd	Santos *et al.*, 1996
fOg30	T	6/14	Négatif [d]	nd	40	oui	34,5 (46,5 ;33 ;28 ;25,5)	Santos *et al.*, 1996 ;1998
fOg44	T	13/14	Négatif [d]	nd	36,5	oui	33 ; 25,5 (42 ;30 ;27,5)	Santos *et al.*, 1996
fOgML34	T	12/14	Négatif [d]	nd	37,3	oui	34 ; 28 (46,5)	Santos *et al.*, 1996 ; 1998
fOg4029	T	13/14	Négatif [d]	nd	39,1	oui	34 (28 ;25,5)	Santos *et al.*, 1996 ; 1998
fOgPSU1	T	12/14	Négatif [d]	nd	36,4	oui		Santos *et al.*, 1996
OE33PA	Ex T	10/38	Négatif [e]	45 ± 3	38.5 ± 0.5	oui	34 ; 32 ; 23	Jaomanjaka *et al.*, 2016
P58I	CS	6/39	nd	16-20	25.3 ± 0.8	nd	nd	Arendt *et al.*, 1990
P37	T	3/4	nd	nd	nd	nd	36,5 ; 27,5	Arendt *et al.*, 1991
P32	T	2/4	nd	nd	nd	nd	34,5 ;27,5	Arendt *et al.*, 1991
P54	T	1/4	nd	nd	nd	nd	34,5 ;27,5	Arendt *et al.*, 1991
PAt5-12	T	2/4	nd	nd	nd	nd	35 ; 28,5	Arendt *et al.*, 1991
PZt11-15	T	2/4	nd	nd	nd	nd	34,5 ; 28	Arendt *et al.*, 1991
S1.1s	T	8/15	nd	55	nd	nd	nd	Henick-Kling *et al.*, 1986b ; Huang *et al.*, 1996
Lco23	T	8/15	nd	nd	38	nd	43; 30; 16; 15	Henick-Kling *et al.*, 1986b ; Huang *et al.*, 1996
L1 (Ia7)	T	7/35	nd	nd	nd	nd	nd	Nel *et al.*, 1987
L4 (Aa1)	T	7/35	nd	nd	nd	nd	nd	Nel *et al.*, 1987
L8 (1890)	T	7/35	nd	nd	nd	nd	nd	Nel *et al.*, 1987
Lo27a	T	nd	nd	nd	31	oui	34 ; 26	Boizet *et al.*, 1992
Lo22a	T	nd	nd	nd	31	oui	34 ; 26	Boizet *et al.*, 1992
Lo27b	T	nd	nd	nd	31	non	45 ;	Boizet *et al.*, 1992

[a] les protéines mineures sont entre parenthèse ; [b] spectre sur des espèces de Lactobacillus et de pédiocoques ; [c] spectre sur *Leuc. citreum* (1) ; *Lc. lactis* (2) ; *P. pentosaceus* (1) ; *Lb. brevis* (1) ; *Lb. casei* (2) ; *Lb. pentosus* (1) et *Lb. plantarum* (3) ; [d] spectre sur *Leuc. mesenteroides (3) ; Leuc. amelibiosum (1); Leuc. carnosum* (1) , *Leuc. citreum* (1), *Leuc. gelidium* (1), *Leuc. pseudomesenteroides* (1), *Pediococcus acidilactici* (1), *P. damnosus* (1), *P. parvulus* (1), *Lb. rhamnosus* (1), *Lb. delbrueckii* (1) *Lc. lactis* (1) ; *P. pentosaceus* (1) ; *Lb. brevis* (1) et *Lb. casei* (1) ; [e] spectre sur *O. kitaharae* (3) ; T, tempéré ; Ex T ; Ex-tempéré ; CS, carrier-state.

Les oenophages se répartissent en 3 à 6 groupes selon les études. L'établissement des cartes de restriction de six phages par Santos *et al.*, (1996) réduit le nombre de groupes à deux, et sont nommés α et β. Concernant la taille des génomes, la somme des fragments de restriction varie de 25,3 à 40 kb. Plus tard, les analyses *in silico* rendent compte d'une gamme allant de 31,3 à 46 kb (Jaomanjaka, 2014). La recherche d'extrémités cohésives, lorsque réalisée, est positive et la seule exception notable est le phage ΦLo27b, isolé à Toulouse par Boizet *et al.*, (1992) (**Tableau XI**). Des expériences d'hybridation moléculaire sont réalisées au cours desquelles les homologies sont recherchées entre une sonde constituée d'ADN phagique marqué, et les fragments de restriction issus d'autres génomes phagiques (**Tableau XII**). Les 16 ADNs testés par Santos *et al.* (1996)

partagent de nombreuses régions de forte homologie avec FogPSU1, et se répartissent en cinq groupes partageant de 59 à 100 % d'homologie. Le phénomène est également observé par Arendt et Hammes (1992; Boizet *et al.*, 1992; Nel *et al.*, 1987 ; Tenreiro *et al.*, 1993). A nouveau, le phage ΦLo27b se démarque, et ne présente pas d'homologie avec les deux autres phages analysés ΦLo27a et ΦLo22a (Boizet *et al.*, 1992).

Tableau XII. Evaluation de la diversité et classification

Modes d'évaluation de la diversité			**Nbre phages analysés**	**Observations**	**Référence**
Méthode		**Caractéristiques**			
Spectre		87 souches	10	4 groupes	Arendt & Hammes, 1992
ADN	Profils restriction	*Hin*fI	20	5 groupes	Nel *et al.*, 1987
		*Eco*RI	17	6 groupes	Santos *et al.*, 1996
		*Eco*RI	5	5 groupes	Arendt *et al.*, 1991
		*Eco*RI ou *Hin*dIII	10	4 groupes	Arendt *et al.*, 1992
	Hybridation moléculaire	5 phages marqués/5	19	Fortes homologies entre les 13 groupes	Tenreiro *et al.*, 1993
		2 phages marqués	3	2 groupes sans homologie	
		Chacun des 5 phages marqués/profils *Eco*RI	5	Régions d'homologies fortes entre tous les phages	
		FogPSU1 marqué/ profils EcoRI	17	5 groupes à % d'homologies variables (59 à 100%)	Santos *et al.*, 1996
	cartes de restriction			2 (α et β)	Tenreiro *et al.*, 1993
Protéines structurales			5	3	Arendt *et al.*, 1991
			10	3	Arendt *et al.*, 1992
			17	3-4	Santos *et al.*, 1996

Il est intéressant de resituer ces résultats à la lumière des analyses *in silico*, même si l'absence de données de séquençage et la non conservation de la majorité des phages isolés sur la période 1980-1990 permet difficilement de les relier aux groupes établis plus tard par Jaomanjaka (2014). La comparaison *in silico* des premiers génomes de prophages montre que l'ordonnancement des gènes est conservé (**Figure 21**).

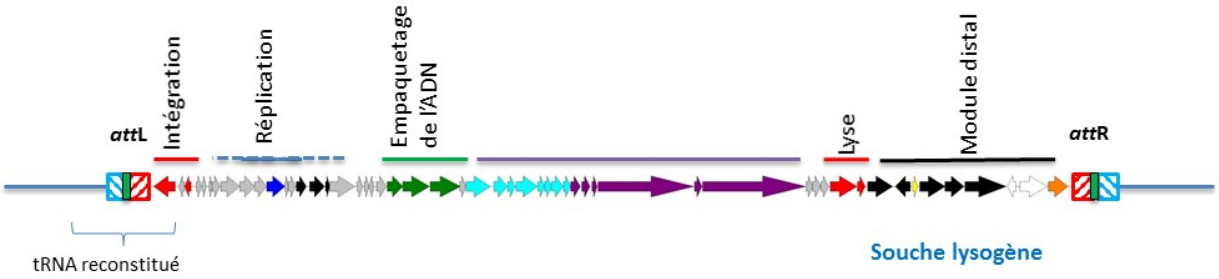


Figure 21. Organisation type d'un prophage chez *O. oeni* (d'après Jaomanjaka, 2014)

Les membres des groupes A, B et C présentent des homologies fortes sur la totalité de leur génome (**Figure 22**). Un cluster distinct est formé par les phages du groupe D, dont les séquences ne montrent pas d'homologie nucléotidique avec les membres des groupes A, B et C. Le cluster D est par ailleurs homogène, et ses membres montrent peu de zones variables. Une distinction

supplémentaire réside dans l'absence de séquences *cos* au sein de génomes des phages D, suggérant un mécanisme d'encapsidation distinct (pac) par rapport aux autres oenophages A, B et C.

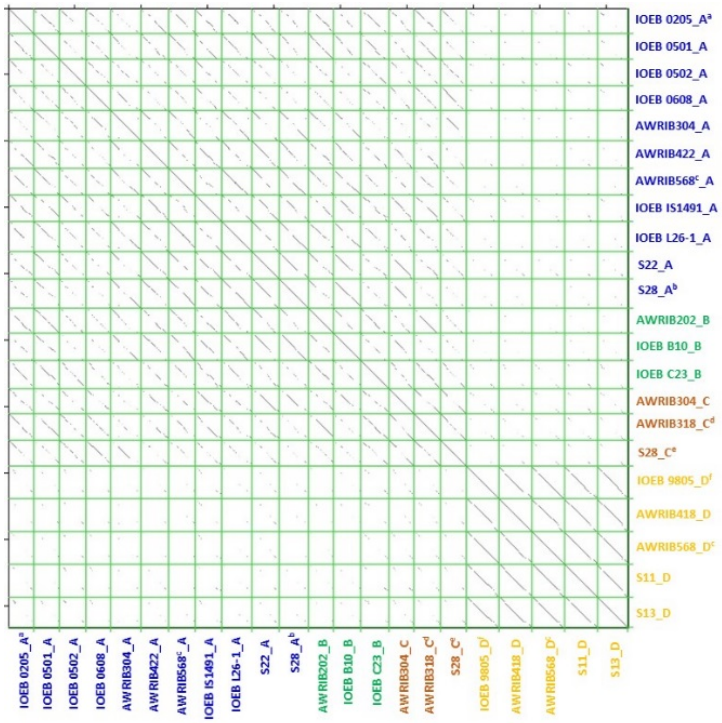


Figure 22. Analyse de génomique comparative des prophages. Les séquences nucléotiques des prophages ont été comparées grâce à Jdotter. Une couleur particulière est assignée à chaque groupe de prophages : Int-A (bleu); Int-B (vert); Int-C (rouge) et Int-D (jaune). (d'après Jaomanjaka, 2014).

En considérant ces éléments issus de l'analyse bio-informatique, il est probable que parmi les nombreux phages isolés par le passé, la grande majorité correspondait à des phages de type A et B. Il est également vraisemblable que Boizet *et al.* (1992) avaient isolé un phage atypique à l'époque, n'appartenant pas aux groupes A et B, et présentant des caractéristiques compatibles avec celles du groupe D. La rareté des phages de type D dans les inventaires antérieurs peut être liée à la faible présence de souches lysogènes de type D dans les panels testés. L'application de concentrations variables en MC dans les études d'induction peut également expliquer en partie ce résultat. L'augmentation de la concentration en MC de 0,3 à 1 µg/ml pourrait être l'élément nécessaire déclenchant l'induction des prophages de type D, alors que 0,3 µg/ml pourrait suffire aux prophages de type A et B. Jaomanjaka *et al.* (2013) ont comparé les concentrations en phage libre en l'absence d'inducteur (induction spontanée) entre quelques souches lysogènes pour des phages de type A, B et D. En accord avec l'hypothèse proposée, des concentrations plus faibles ont été mesurées pour les souches de type D, par rapport aux types A et B, suggérant bien que la stabilité des prophages de type D est supérieure à celles des autres prophages. Gindreau *et al.* (1997) avaient auparavant

montré un fort taux d'induction spontané chez la souche B10, lysogène pour le phage Φ10MC (type B). Il serait donc intéressant d'évaluer si les prophages de type D portent des fonctions particulières conférant une plus grande stabilité de l'intégration.

4.4. Le cycle lytique et le potentiel de destruction de l'hôte bactérien

Le cycle infectieux se caractérise grâce à la notion de *burst-size*, qui traduit le nombre de particules libérées par cellule infectée après la lyse. Des valeurs de 25, 55 et 45 ont été mesurées pour les phages 1002, ΦLcO23 et OE33PA (Huang *et al.*, 1996 ; Jaomanjaka *et al.*, 2016). En milieu MRS, le cycle de OE33PA dure une dizaine d'heures (Jaomanjaka *et al.*, 2016). La lyse est notamment rendue possible grâce à la présence d'une endolysine et d'une holine virales. La lysine du phage Fog44 (Lys44) a été particulièrement étudiée car il s'agit d'une lysine sécrétée à laquelle les cellules d'*O. oeni* sont résistantes. L'activité de Lys44 nécessite la dissipation de la force proto-motrice, phénomène induit par la holine Hol44 durant l'infection phagique (Nascimento *et al.*, 2008; São-José *et al.*, 2000).

Le pouvoir lytique d'un phage dans un environnement où plusieurs souches de l'espèce peuvent co-exister se traduit également par le spectre d'hôte. Toutes les études menées montrent qu'il est plutôt large. Ainsi, parmi 112 souches testées, le phage 1002 en lyse 52. Les spectres semblent néanmoins restreints aux souches de l'espèce *O. oeni,* et les autres BL (*Pediococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc*) ne sont pas sensibles aux oenophages.

4.5. Infection phagique : une source de défauts de FML ?

Le risque direct lié à la présence de phages est de voir la population de *O. oeni* chuter et être insuffisante pour déclencher la FLM. Un effet indirect consisterait en une modification non pas quantitative, mais qualitative des flores. Dans ce scénario, d'autres espèces capables de faire la FML se développeraient, donnant naissance à un produit de moindre qualité organoleptique.

La mise en évidence d'un lien entre le développement d'oenophages et un défaut de FML dans les vins est une mission complexe. Les études menées jusqu'à présent ont privilégié deux types d'approches.

Le suivi de fermentations dans les caves/domaines

Des suivis de FML au sein de caves ont été couplés à une recherche parallèle de phages dans les échantillons. Cette approche a été menée par trois équipes en Allemagne (Arendt), en Suisse (Sozzi)

et en Australie (Henick-Kling) dans les années 1980-1990. La recherche de phages visait à apprécier la diversité des phages présents (MET et spectres) mais aucune quantification n'a été réalisée. Par ailleurs, aucune étude n'a testé les phages présents vis-à-vis des bactéries indigènes, c'est-à-dire isolées des mêmes échantillons.

En Suisse, les auteurs ont pu montrer que les échecs de FML ne sont pas systématiquement corrélés à la présence de phages. Parmi les causes possibles, la concentration résiduelle en anhydride sulfureux total a été incriminée (Cazelles & Gnaegi, 1982; Gnaegi *et al.*, 1984; Sozzi *et al.*, 1982). Cazelles et Gnaegi (1982) rapportent cependant le suivi d'une cave D, dans laquelle les vins réalisent une FML spontanée, sans ensemencement. Trois des onze cuves suivies réalisent correctement cette étape et ne présentent pas de phages. Les huit cuves restantes connaissent des ralentissements ou blocages, et des phages sont mis en évidence. Par ailleurs la population dominante de bactéries dans ces vins ayant réussi tardivement leur FML sont affiliés à des souches du genre *Pediococcus*. Sozzi *et al.* (1982), en suivant quatre vins inoculés par une souche unique (Lco22, lco23, Lco26 ou Lco27), montrent également des cas de FML irrégulière (vin GV2) ou bloquée (vins 530, Joha. et 512). Dans les quatre vins, plusieurs phages sont isolés et se révèlent actifs vis-à-vis de la souche ensemencée. Enfin, Arendt et Hammes (1992) testent 34 vins à FML problématique et visualisent la présence de phages dans 10 échantillons. Ganegi *et al.* (1984) notent que les caves ayant subi des attaques virales en 1981 n'ont pas eu de difficultés lors de la vinification du millésime 1982.

La reproduction de l'infection en conditions de laboratoire

Une seconde série d'études a eu pour objectif de reproduire les conditions d'une infection dans un vin, ou en milieu MRS. Le vin a été débarrassé de sa flore par filtration après l'étape de FA (Henick-Kling *et al.*, 1986a et b) ou pas (Davis *et al.*, 1985). Il a été ensuite inoculé par une concentration élevée de cellules sensibles, prélevées en phase stationnaire. Il peut s'agir d'une souche ou bien d'un mélange de souches commerciales. Les multiplicités d'infection ne sont pas communiquées, limitant les conclusions sur la dynamique des populations mesurées. Seuls Davis *et al.* (1985) indiquent une concentration en phages à l'inoculation de 10^3 UFP/ml à 10^4 UFP/ml. Ces auteurs introduisent les phages 58 et 84 dans deux vins (Shiraz et Cabernet-Sauvignon, respectivement) présentant des pH, teneurs en éthanol et en SO_2 proches. Aucune interférence des phages dans le déroulement de la FML n'est observée dans le Shiraz. Cependant, le Cabernet-Sauvignon voit sa population en *O. oeni* chuter d'un facteur 1000 par rapport au témoin et la FML marque un arrêt au $13^{ème}$ jour. Elle repart mais avec une vitesse réduite et s'accompagne du développement de Pédiocoques. Des travaux similaires sont menés par Henick-Kling *et al.* (1986a) qui analysent la dynamique de la FML dans un vin rouge (Cabernet-Sauvignon et Shiraz) inoculé par un mélange de souches commerciales. Le vin est ensuite infecté par un phage actif sur l'une des souches du levain. Les auteurs observent une

légère croissance après l'inoculation, puis rapidement un léger déclin de la population bactérienne dès le jour 3 jusqu'au jour 38 ($8x10^5$ UFC/ml à $1x10^4$ UFC/ml). Une seconde phase d'attaque virale intervient au jour 67 et la croissance ne reprend qu'à partir du $105^{ème}$ jour. Lors de ces attaques, la dégradation du L-malate s'arrête. Les auteurs notent que le vin termine néanmoins sa FML.

Une fois la démonstration faite que la prédation des bactéries par les phages peut se dérouler dans un milieu aussi hostile et complexe que le vin, les auteurs cherchent à comprendre l'impact de chaque contrainte associée au milieu : acide, éthanol, température, ou encore teneur en SO_2. Des expériences d'infection phage-bactérie sont menées en milieu modèle, en faisant varier l'un des paramètres physico-chimiques. L'infection par les phages Lco23 ou S1.S en MRS est étudiée par Henick-Kling *et al.* (1986b) en MRS modifié, ou en milieu vin. Les auteurs testent l'effet du pH sur une gamme allant de 5,5 à 3,5. Ils observent pour le phage S1.S que plus le pH est acide, moins les phages lysent la population. Ainsi, le pourcentage de lyse lié à la multiplication du phage après 7 jours de culture est de 100%, 60% et 35% aux pH 5,5 ; 4,5 et 3,5 ; respectivement. Un phénomène inverse est mesuré pour le phage Lco23, suggérant une hétérogénéité de la résistance au vin au sein des oenophages. L'étude montre également que la présence de SO_2 a une incidence sur le cycle viral tandis que Davis *et al.* (1985) évoquent l'impact négatif de la bentonite, utilisée pour le collage, la clarification, le débourbage et la stabilisation des vins blancs ou rosés. Le cas de l'éthanol est controversé. Alors que Henick-Kling et ses collaborateurs ne voient aucun effet lorsque le taux est inférieur à 5%, Costantini *et al.* (2017) suggèrent que l'infection virale est facilitée dans ces mêmes conditions.

De façon intéressante, Henick-Kling *et al.* (1986b) réalisent quelques études en milieu vin et montrent qu'aucun des deux phages testés n'impacte la FML dans un vin blanc, ce qui suggère que des facteurs spécifiques existent dans les différents types de vin. Les auteurs proposent que l'acide caféique, présent en plus forte concentration dans les vins blancs testés (par rapport aux vins rouges) pourrait être à l'origine d'une inhibition de la prédation d'*O. oeni* par les phages. Ce phénomène est conforté par les travaux de Lee *et al.* (1985) sur le modèle du phage PL-1 infectant la souche non œnologique *Lactobacillus casei* S.

Les expériences précédentes permettent de mettre en évidence l'interférence des paramètres physico-chimiques sur l'infection mais on ne peut savoir si elle est liée à une altération des particules et/ou de l'enveloppe bactérienne. Jaomanjaka *et al.* (2013) ont testé l'impact du pH et de l'éthanol sur les particules. Après incubation, la population active résiduelle de phages est ensuite dénombrée. Les travaux montrent que les particules sont inactivées rapidement en présence d'un pH acide, mais pas ou peu en présence d'éthanol. Le fait que le vin inactive les particules a par ailleurs un impact important sur l'utilité de la technique de la double-couche pour dénombrer les phages. Les niveaux

de population active mesurés par cette technique seront de fait inférieurs aux mesures de population réelle réalisées par approche moléculaire comme la qPCR comme démontré par Jaomanjaka *et al.* (2013).

L'émergence de souches résistantes lors de FML difficiles

L'isolement de souches sensibles et résistantes aux phages pendant des FML où une attaque virale a été diagnostiquée a été rapporté (Davis *et al.*, 1985). Les auteurs ont proposé que des populations différentes de bactéries existent dans le vin au départ de l'infection, et se distinguent par des différences de la composition de l'enveloppe, de sa structure ou de son organisation. Etant donné que les récepteurs des phages sont sur l'enveloppe, les modifications de cette structure moduleraient la sensibilité au phage, expliquant la présence de souches sensibles et résistantes. Dans ce modèle, la diversité serait suffisante pour palier à la disparition de certaines souches et la FML se déroulerait tout de même. L'autre hypothèse avancée est qu'en présence de phages, des dérivés résistants émergent au cours de la fermentation à partir des souches sensibles de départ (Davis *et al.*, 1985; Henick-Kling *et al.*, 1986b). L'émergence est indépendante du mécanisme CRISPR qui est absent dans l'espèce *O. oeni*. De tels clones nommés Bacterial Insensitive Mutants (BIMs) ont été isolés en présence du phage ex-tempéré OE33PA (fréquence entre 4.75×10^{-5} et $8{,}14 \times 10^{-5}$) et il a été montré qu'il ne s'agissait pas de dérivés lysogénisés (Jaomanjaka, 2014). Leur émergence suggère l'accumulation de mutations dont certaines permettant aux bactéries d'échapper à la prédation. Leurs capacités de croissance ont été comparées à celles de la souche originale et nous avons noté une baisse significative de constantes de croissance et une sensibilité aux contraintes du vin, qui est l'expression du coût associé aux mutations (De Coudenhove, 2015).

Les interactions phage-bactéries sont complexes dans les environnements naturels (Diaz-Munoz & Koskella, 2014). Il existe différentes théories de co-évolution antagoniste phage-bactéries (Stern & Sorek, 2011). La théorie dite de course à l'armement prédit l'apparition de phages mutants capables d'infecter les BIMs. Ces relations phages-bactéries sont considérées comme un processus central qui génère et maintient la diversité parmi les bactéries. Il existe un autre modèle dit "kill-the-winner", qui explique le phénomène par des fluctuations en fonction de la densité cellulaire de souches hôtes sensibles résistantes (Winter *et al.*, 2010). Ces fluctuations résulteraient de périodes de sélection qui alterneraient. Dans un premier temps, les phages qui infectent les hôtes sensibles augmentent en population, sélectionnant l'apparition de bactéries mutantes. En conséquence, les concentrations en phages chuteraient, ôtant la pression virale. Ensuite, les bactéries résistantes seraient dépassées en nombre par les souches sensibles, étant donné que les bactéries résistantes ont un coût de résistance. Ce modèle ne nécessite donc pas l'émergence de phages résistants.

La dynamique de la prédation entre *O. oeni* et ses phages est très complexe, car elle opère dans un environnement dont les paramètres physico-chimiques fluctuent, et dans lequel de nombreuses BL et phages évoluent aux côtés d'*O. oeni*, offrant des possibilités de transferts de gènes. La présence de systèmes de restriction-modification (RM) dans le génome cœur de certaines souches, et le fait que les prophages eux-mêmes portent des mécanismes de résistance contre les phages est certainement une illustration de cette grande complexité (Jaomanjaka, 2014).

4.6. La lysogénie chez O. oeni et impact sur la sélection des levains

Dès 1982, Sozzi et ses collaborateurs recommandent de sélectionner les levains sur leur niveau de résistance aux phages, et de mettre au point des mélanges de rotation. Les préconisations n'ont pas été suivies et les sélectionneurs de levains considèrent peu ce critère. Deux points de vigilance restent à mieux renseigner. Le premier est de définir si la sélection de souches résistantes aux phages est un critère à suivre. L'isolement de nouveaux phages strictement lytiques dans cette étude tendrait à le conseiller. Les risques pourraient se situer au niveau de la production de levains ou de l'acclimatation des souches avant inoculation. Le second point concerne la conduite à tenir vis à vis des souches lysogènes. Ce caractère est soigneusement évité lors de la sélection de levains laitiers. En effet, l'inoculation de levains lysogènes pourrait provoquer l'excision des prophages dans le milieu et la lyse des souches. De plus l'infection de souches lysogènes par d'autres phages pourrait générer des échanges génétiques entre le prophage et le phage surinfectant, et favoriser l'émergence de phages lytiques. Paradoxalement, de nombreux levains FML commerciaux sont lysogènes (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Les risques sont à comparer avec d'éventuels bénéfices associés à la lysogénie chez *O. oeni*, comme la résistance aux phages, ou encore une résistance aux contraintes. Une analyse bénéfice-risque de la lysogénie doit donc être approfondie.

4.7. Les phages peuvent-ils être des outils de bioprotection en œnologie ?

Des approches de biocontrôle de BL indésirables ont été testées avec succès dans des processus de fabrication d'éthanol, montrant que les phages peuvent agir en milieu très contraignant du point de vue des conditions physico-chimiques. En fonction de l'évolution des législations dans le secteur, les phages de BL pourraient être utilisés afin de contrôler les BL indésirables, sources de maladies du vin. Leur usage pourrait également permettre de réduire la population de *O. oeni* lorsque la FML n'est pas souhaitée dans les vins. De plus, d'autres bactéries indésirables pourraient être ciblées comme les bactéries acétiques. Enfin, l'action au niveau des fermentations pourrait être pensée en amont

dans les vignobles. Un premier essai de contrôle de l'agent pathogène de la vigne *Xylella fastidiosa*, l'agent de la maladie de Pierce, a été mené aux USA grâce un cocktail de quatre phages lytiques, montrant un intérêt prophylactique et thérapeutique (Das *et al.*, 2015).

Matériels et méthodes

I. Matériel biologique et conditions de culture

1. Panels de souches

Un ensemble de 89 souches d'*O. oeni* a été utilisé dans cette étude. Parmi celles-ci, seules 29 souches ont été utilisées au laboratoire (**Tableau XIII**). Soixante génomes bactériens ont été inclus dans l'étude *in silico* de génomique comparative des prophages (**Tableau XIV).**

Tableau XIII. Liste des souches d'*O.oeni* utilisées dans cette étude

	Présence de prophages*				MLST	Origine	
Nom	A	B	C	D			Référence
IOEB C52					C	Cidre, Normandie, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
B10					A	France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
CiNe					A	Starter CHR Hansen	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 0205					A	France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 0501					A	Vin rouge, france	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 0502					B	France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 0608					A	France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 14203					A	Non renseignée	Khoury, 2014
IOEB 1491					A	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 8417					B	Vin rouge filant, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 9517					A	Floc de Gascogne, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 9803					B	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB 9805					B	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB B16					A	Lactoenos B16 Laffort, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB C23					B	Cidre, Normandie, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB C28					B	Cidre, Bretagne, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB L26_1					A	Liban	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB Sarco 277					A	SB3 Laffort, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
IOEB Sarco 450					A	450 PreAc Laffort, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
PSU-1					A	Vin rouge, USA	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco 28					A	B28 PreAc, Laffort, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S11					A	Vin blanc effervescent, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S12					B	Vin blanc, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S13					B	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S15					A	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S161					A	350 PreAc Laffort, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S19					A	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S22					A	Vin blanc, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015
Sarco S25					A	Vin rouge, France	Campbell-Sills *et al.*, 2015

*selon la classification des prophages établie par Jaomanjaka *et al.* (2013)

Tableau XIV. Souches d'*O.oeni* inclues dans l'étude de génomique comparative

Souche	Présence de prophages*				MLST	Origine	
Nom	A	B	C	D			Référence
Awri1062					B	Australie, 2014, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri1116					A	1992, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri124					A	Australie, 1988	Sternes and Borneman, 2016
Awri126					A	1992, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri127					A	1992, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri128					A	1992, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri131					A	Non renseignée	Sternes and Borneman, 2016
Awri133					A	Non renseignée	Sternes and Borneman, 2016
Awri141					A	Australie, 1980	Sternes and Borneman, 2016
Awri150					A	Australie, 1980, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri202					A	Australie, 1994, Carbernet Sauvignon	Sternes and Borneman, 2016
Awri304					A	Australie, 1999, Zinfandel	Sternes and Borneman, 2016
Awri316					A	Non renseignée	Sternes and Borneman, 2016
Awri318					A	1964	Sternes and Borneman, 2016
Awri330					A	Australie, 1982, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri333					A	Australie, 1982, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri334					A	Australie, 1982, Pinot noir	Sternes and Borneman, 2016
Awri335					A	Australie, 1981, Shiraz	Sternes and Borneman, 2016
Awri342					A	Australie, 1981, Shiraz	Sternes and Borneman, 2016
Awri346					A	Australie, 1981, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri418					B	USA	Sternes and Borneman, 2016
Awri422					A	France, Champagne	Sternes and Borneman, 2016
Awri424					A	Australie, 2002, Cabernet Sauvignon	Sternes and Borneman, 2016
Awri429					A	Lallemand	Sternes and Borneman, 2016
Awri438					A	2001, Cabernet Sauvignon	Sternes and Borneman, 2016
Awri454						Australie, 2002, Vin blanc	Sternes and Borneman, 2016
Awri460					A	Australie, 2002	Sternes and Borneman, 2016
Awri490					A	Australie, 2004, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri503					A	Australie, 2004, Grenache	Sternes and Borneman, 2016
Awri508					A	Australie, 2004, Grenache	Sternes and Borneman, 2016
Awri509					A	Australie, 2004, Grenache	Sternes and Borneman, 2016
Awri548					A	France, Champagne	Sternes and Borneman, 2016
Awri568					A	Australie, 2008, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri576					A	Australie, 2008, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri583					A	Australie, 2008, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri683					B	Australie, 2009, Pinot Gris	Sternes and Borneman, 2016
Awri706					A	2009, vin rouge	Sternes and Borneman, 2016
Awri708					A	Australie, 2009, Merlot	Sternes and Borneman, 2016
Awri816					B	Non renseignée	Sternes and Borneman, 2016
Awri847					A	Australie, 2012, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri858					A	Australie, 2012, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
Awri867					A	1986	Sternes and Borneman, 2016
Awri880					B	1994	Sternes and Borneman, 2016
Awri887					A	1986	Sternes and Borneman, 2016
Awri888					A	1985	Sternes and Borneman, 2016
Awri984					A	Australie, 2011, Chardonnay	Sternes and Borneman, 2016
CRBO 14210					A	Non renseignée	Campbell-Sills *et al*., 2017
CRBO 11105					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14110					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14194					A	Non renseignée	Campbell-Sills *et al*., 2017
CRBO 14196					A	Non renseignée	Campbell-Sills *et al*., 2017
CRBO 14198					A	Non renseignée	Campbell-Sills *et al*., 2017
CRBO 14203					A	Non renseignée	Campbell-Sills *et al*., 2017
CRBO 14209					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14221					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14222					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14223					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
CRBO 14238					nd	Non renseignée	Khoury, 2014
OM22					nd	Italie	Capozzi *et al.*, 2010

*selon la classification des prophages établie par Jaomanjaka *et al.* (2013)

- Des souches de différentes espèces de BL ont été intégrées à l'étude, notamment pour réaliser des spectres d'hôte. La liste de ces souches est disponible **Tableau XV**.

Tableau XV. Liste des souches de BL utilisées

Espèce	Souche	Origine
O. kitaharae	NRIC_0647, NRC_0649, NRIC_0650	Résidus de Shochu, Japon
O. alcoholitolerans	JP736, M7212	Production de bioéthanol (Collection Marcos de Morais, UFP, BR)
Lactobacillus plantarum	AL2, AL210, ERS1.11, lp80	CRBOeno
Pediococcus pentosaceus	ICP01, NRRC, ATCC3316	CRBOeno
L. crespatus	112.59A, 107.7B, 100.16A,	Patientes atteintes de vaginose (Afrique du Sud) (Collection Rémy Froissart, CNRS Montpellier)
L. gasseri	107.7A, 114.1A, 117.75A	
L. jensenii	37.31B, 113.22A	
L. rhamnosus	A23, 51A, 57A1, 46A, 52B, 24A, 35A, A22, A21, RZD2, 27C, 21B, 25A,	Cavité bucale (Collection Johan Samot)
L. plantarum	BMS2	
L. fermentum	BAP3	

- Les 17 souches de BA retenues pour la recherche de phages ont été obtenues de la collection du CRB Œno (Centre de Ressources Biologiques Œnologiques).

Tableau XVI. Liste des souches de BA utilisées dans cette étude

Espèce	Nom	Origine
Acetobacter aceti	08ba14	Raisin, Aquitaine, 2008
	CIP103111	vinaigre
	ATCC15973	vinaigre
Acetobacter pasteurianus	03ba01	2003
	03ba02	2003
	08ba01	Raisin, Aquitaine, 2008
	08ba03	Raisin, Aquitaine, 2008
Gluconobacter cerinus	11174	Baies de raisin à maturité, non traitées contre *Botrytis*, INRA site Grande Ferrade, 2011
	11176	Baies de raisin à maturité, non traitées contre *Botrytis*, INRA site Grande Ferrade, 2011
	11178	Baies de raisin à maturité, non traitées contre *Botrytis*, INRA site Grande Ferrade, 2011
	11179	Baies de raisin à maturité, non traitées contre *Botrytis*, INRA site Grande Ferrade, 2011
	96ba02	Raisin, Haut-Brion, 1996
	97ba39	Raisin, stade roti, la tour blanche, 1997
Gluconobacter oxydans	11187	Baie de raisin à maturité, non traitées contre *Botrytis*, INRA site Grande Ferrade, 2011
	11203	Baies non traitées contre *Botrytis*, Léoville, 2011
	11204	Baies non traitées contre *Botrytis*, Léoville, 2011
	11205	Baies non traitées contre *Botrytis*, Léoville, 2011

2. Conditions de culture et de conservation des bactéries

Les souches d'*O. oeni* sont cultivées en milieu MRS (De Man *et al.*, 1960) acidifié à pH 4,8. Le milieu MRS (Difco) est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée d'HCl (37%). Les cultures sont incubées à 25°C dans des tubes de 15 ml. Les autres BL sont cultivées en milieu MRS à pH non modifié et à 30°C.

Le milieu « jus de raisin » ou JR a été mis au point au laboratoire. Il contient pour 1 L : 250 ml de jus de raisin rouge commercial, 5 g d'extrait de levures et 1 ml de Tween 80. Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée (5N) de NaOH. Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d'agar (20 g/l).

Les BA sont cultivées en milieu YPM (Yeast extract 5 g/l, Peptone 3 g/l, Mannitol 25 g/l) ajusté à pH 5, sous agitation à 180 rpm et à 25°C.

Tous les milieux et solutions utilisés dans cette étude sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

Pour conserver les souches, une culture liquide en phase exponentielle de croissance est ajoutée de 30% de glycérol (v/v), homogénéisée et placée à -20 ou -80°C.

3. Suivi de la croissance bactérienne

3.1. Mesure de DO

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}) à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1280, Shimadzu). Pour l'espèce *O. oeni*, une unité de DO_{600} représente une concentration de 2×10^9 UFC/ml (unité formant colonie/ml) en milieu MRS. La DO_{600} peut également être mesurée dans une microplaque de 96 puits stérile. Lors de la mise en œuvre d'un grand nombre de conditions expérimentales et/ou avec un volume restreint, un volume de 200 µl de culture est transféré dans chaque puit.

3.2. Dénombrement bactérien

Le dénombrement bactérien est réalisé sur une base de milieu JR, permettant une croissance plus rapide des colonies.

A partir d'échantillons de vin

A partir d'échantillons de vins, le milieu gélosé jus de raisin est supplémenté en pimaricine, après stérilisation, (DELVOCID Instant, DSM) à raison de 0,1 g/L pour inhiber la croissance des levures afin de dénombrer les bactéries totales (BT). Pour dénombrer les BA du vin, le milieu JR est supplémenté en pimaricine (DELVOCID Instant, DSM) (0,1 mg/ml) et en pénicilline (Sigma) (0,0125 mg/ml) afin d'inhiber la croissance des bactéries Gram +. La population de BL est estimée par soustraction du nombre de BA au nombre de BT.

L'échantillon de vin est dilué dans de l'eau physiologique (9 g/l de NaCl). Un volume de 100 µl de chaque dilution décimale est étalé sur boîte à l'aide de billes de verre 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 unité formant colonies par ml (UFC/ml), selon la formule N = (n x 10) x 1/c ; où n est le nombre de colonies et c le coefficient de dilution. La limite de détection est alors de 10 UFC/ml.

A partir d'une culture bactérienne

Une technique plus rapide et moins onéreuse a été utilisée lorsque de nombreuses modalités étaient mises en œuvre lors des expérimentations. La suspension bactérienne est alors diluée en cascade en microplaques 96 puits stérile, dans un volume total de 200 µl. Des spots de 10 µl sont réalisés en duplicat sur gélose JR. Après une incubation de 7 jours à 25°C, les dilutions permettant de dénombrer entre 10 et 50 colonies sont utilisées pour le calcul de la concentration bactérienne, qui est exprimée en unité formant colonies par ml (UFC/ml), selon la formule N = (n x 100) x 1/c ; où n est le nombre de colonies et c le coefficient de dilution. La limite de détection est alors de 100 UFC/ml.

II. Isolement des phages à partir d'échantillons œnologiques

1. Phages infectant *O. oeni*.

1.1. Préparation des échantillons de vins

Afin d'isoler des phages éventuellement présents dans les échantillons œnologiques, deux protocoles de préparation des échantillons ont été utilisés (**Figure 23**).

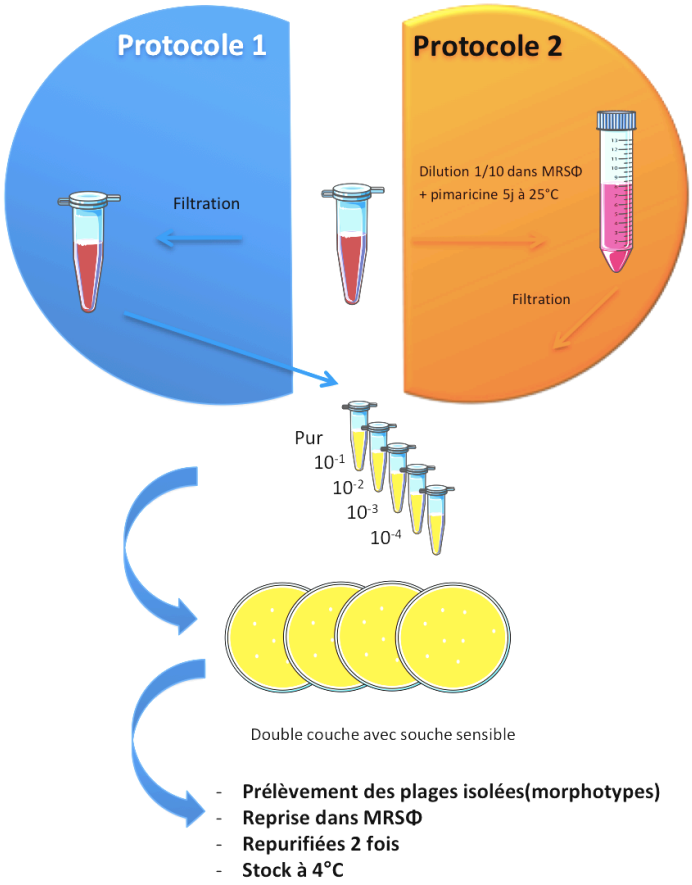


Figure 23. Préparation des échantillons pour la recherche de phages

- Lors du protocole 1 l'échantillon brut est centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes puis filtré sur membrane PES (polyethersulfone) 0,22 µm. Les travaux de Mocé-Llivina *et al.* (2003), ont montré qu'aucune adsorption des oenophages sur la membrane n'est observée.
- Avec le protocole 2, l'échantillon est d'abord dilué au 1/10^{e} dans du bouillon MRSΦ additionné de pimaricine puis incubé pendant 5 jours à 25°C. L'échantillon dilué est ensuite centrifugé et filtré de la même façon que dans le protocole 1. Ce protocole permet de multiplier les cellules d'*O.oeni* indigènes, et ainsi de (I) propager les phages potentiellement présents si les souches sont sensibles et/ou (II) induire les prophages des souches lysogènes.

1.2. La double couche : titration d'échantillons environnementaux et de lysats phagiques

La concentration en phages des filtrats est déterminée par la technique de la double couche (Adams, 1959). Les milieux utilisés pour la technique de la double couche et pour les essais d'infection correspondent à une base de milieu de culture additionnée de $CaCl_2$ et de $MgSO_4$ (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 « ϕ » pour le différencier du milieu sans cations.

Une gamme de dilutions décimales du lysat filtré est réalisée en tampon phage (Tris 0,01M pH 7,5 ; $MgSO_4$ 0,01M ; NaCl 4 g/l). Un aliquot de chaque dilution (100 µl) est mis en contact avec une souche bactérienne sensible (200 µl à DO_{600}= 0,2 – 0,3) dans un tube contenant une gélose MRSϕ 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 MRSϕ (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 (dès 48 h), car elles étaient plus difficilement détectables 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 x 10) x 1/c ; où n est le nombre de plages de lyse et c le coefficient de dilution. La concentration est exprimée en unité formant plage 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 (MRSϕ) 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 µl. 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 x 100) x 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.

1.3. Repiquage des plages de lyse et purification des phages

Les différentes plages de lyse obtenues sont comparées visuellement selon, la taille (petite Ø ≤ 1 mm, moyenne 1 mm < Ø ≤ 3 mm, grande Ø > 3 mm) et l'aspect (clair ou trouble). Le prélèvement dans la gélose molle de chaque type de plage de lyse est réalisé à l'aide d'une pipette en verre. Le matériel aspiré est transféré dans 500 µl de milieu MRSΦ. Après 30 min à température ambiante, les

phages contenus dans la gélose molle ont diffusé dans le milieu. Une gamme de dilutions de cet échantillon est ensuite réalisée puis analysée par la technique de la double couche avec la même souche de propagation IOEB S277 afin d'obtenir des plages de lyses isolées et homogènes. Une plage est à nouveau prélevée et la procédure de purification est répétée deux fois.

1.4. Production d'un lysat phagique concentré

En milieu solide

Après purification des phages à partir des plages de lyse, ces dernières sont reprises dans un volume de 500 µl. Cette suspension est diluée de façon décimale et un volume de 100 µl de chaque dilution est testé en double couche avec la souche utilisée pour l'isolement. La concentration de suspension virale donnant une lyse confuente est repérée et un ensemble de 10 boîtes sont préparées dans les mêmes conditions. Après incubation (environ 5 jours), les 10 géloses molles sont récupérées à l'aide d'une spatule stérile, réunies et centrifiguées à 5000 *g* pendant 10 min. Le surnageant est ensuite filtré sur membrane PES 0,22 µm.

En milieu liquide

Cette technique est plus rapide et a été préférée dans cette étude. Elle a permis d'obtenir des lysats concentrés de 10^6 à 10^{10} UFP/ml.

La propagation des phages purifiés est réalisée en milieu MRSΦ liquide. Dans le cas d'une première propagation à partir d'une plage de lyse pure, 10 ml de culture en phase exponentielle à DO 0,1 de la souche de propagation sont additionnés de 50 µl (20 µl dans le cas des phages lytiques présentant des plages claires) de suspension virale. Lorsqu'un stock a déjà été préparé, la propagation est effectuée à la MOI optimale pour les oenophages, d'environ 1/300.

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. Lorsque la lyse est observée, la culture est débarrassée des cellules bactériennes par centrifugation (10000 *g*, 5 min) et filtrée (0,22 µm).

2. Phages infectant les bactéries acétiques

La procédure d'isolement et de propagation des phages isolés est la même que celle décrite pour les phages d'*O.oeni*, avec quelques modifications.

Seuls quelques échantillons issus du protocole 1 décrit précédemment ont été utilisés pour rechercher les phages éventuellement présents dans les échantillons de vins sur des souches de différentes espèces de bactéries acétiques du vin. Ainsi plusieurs souches indicatrices d'*A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* et *G. cerinus* ont été utilisées en double-couche. Lors de la réalisation de la technique de la double couche et de la propagation des phages, le milieu YPM a également été supplémenté en $CaCl_2$ 16 mM (YPMΦ).

Les plages de lyses observées étant de taille réduite, l'ajout de glycine dans la gélose molle a été testé (100 mM, Le Marrec *et al.*, 1997), mais n'influence pas la taille des plages.

III. Obtention de clones résistants aux bactériophages

1. Obtention de dérivés lysogènes

Induction de souches lysogènes

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. Le protocole suivi a été optimisé (Jaomanjaka, 2014) sur la souche B10 lysogène pour le phage ϕ10MC isolé précédemment et conservé au laboratoire (Gindreau *et al.*, 1997).

La MC a été ajoutée à une culture en tout début de phase exponentielle (DO_{600nm}= 0,1), à une concentration finale de 1 µg/ml. Un témoin sans MC est réalisé en parallèle. Les deux cultures sont ensuite incubées à l'obscurité à 25°C. La DO_{600} est suivie pendant 48 h 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 (Adams et Anderson, 1960) en présence de la souche permissive IOEB S277. Elle est comparée à la valeur obtenue pour la culture non induite.

Isolement de dérivés lysogéniques

Les phages libres ou les prophages induits par MC sont mis en contact avec les souches non lysogènes IOEB S277 et S25, par la technique de la double-couche.

Les plages de lyse troubles obtenues sont repiquées dans 1 ml de MRS puis incubées 4 jours à 25°C. La présence éventuelle de phages va sélectionner les cellules lysogénisées qui vont être les seules

capables de proliférer. Un isolement sur gélose JR est ensuite réalisé afin de repiquer des colonies et vérifier leur statut de lysogène par PCR.

2. Obtention de mutants résistants à des phages lytiques (BIMs)

Des clones résistants sont générés de façon spontanée à partir de la souche sensible IOEB S277. La souche est infectée par un phage lytique à un MOI de 0,3. L'apparition d'un trouble, marquant une reprise de croissance, dans la culture bactérienne après l'obtention d'une lyse est observée après 5 à 6 jours selon le phage. Une numération bactérienne est effectuée sur gélose JR et plusieurs colonies (n=20) sont isolées afin de caractériser les éventuelles résistances acquises. Une approche de typage par PCR ciblant les régions TR1 et TR2 (Claisse & Lonvaud-Funel, 2012) des clones isolés est réalisée pour s'assurer de la présence du même fond génétique chez la souche native et le clone résistant. L'absence de lysogénie est également confirmée par PCR.

La résistance de ces clones aux phages de challenge est évaluée par la technique de la double-couche.

IV. Etude de l'impact des polyphénols sur le développement lytique

Les différents composés phénoliques testés dans cette étude sont recencés **Tableau XVII**. Les molécules pures (97% minimum) ont été fournies par Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), et resolubilisées dans l'éthanol.

Tableau XVII. Composés phénoliques testés

Famille	Molécule
Flavonols	Quercétine
	Quercétine-3-*O* glucuronide
	Myricétine
	Kaempférol
	Morine
	Rétusine
Flavone	Apigénine
Stilbènes	Resvératrol
	Picéide
Acides phénoliques	Ac. coumarique
	Ac. caféique
	Ac. cinnamique

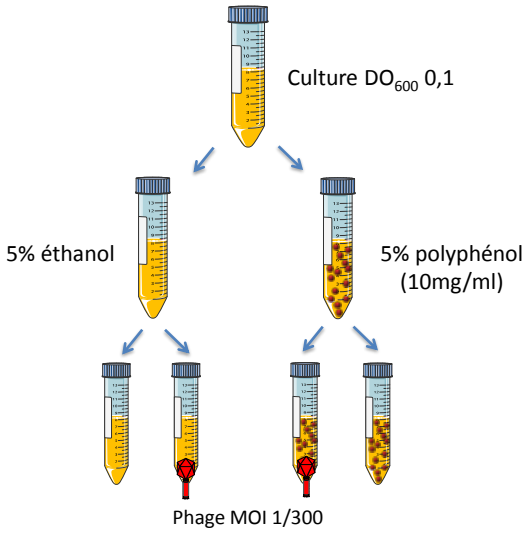


Figure 24. Dispositif expérimental des tests d'infection en présence de composés phénoliques.

Essais d'infection en présence/absence de polyphénols

Pour réaliser les essais, une culture de la souche sensible IOEB S277 préparée en MRSΦ est séparée en deux en début de phase exponentielle (DO=0,1). La moitié reçoit le polyphénol, et l'autre constitue le témoin. La concentration finale en polyphénol est de 50 µl/ml. Une solution mère concentrée est préparée à 10 mg/ml afin d'ajouter 5% de cette solution à la culture bactérienne. Dans le témoin, le même taux d'éthanol est ajouté.

Chaque partie est subdivisée à son tour en deux, et l'un des échantillons est infecté par le phage à la MOI de 1/300 (**Figure 26**). L'évolution de la lyse en présence ou en absence du polyphénol est mesurée par suivi de DO_{600nm}, et par dénombrements sur milieu gélosé. Le milieu « Jus de Raisin » (JR) a été retenu pour une croissance plus rapide des colonies.

Le suivi de la production de particules virales infectieuses est réalisé grâce à la technique de la double-couche avec la souche IOEB S277.

V. Méthodes de caractérisation

1. Observation en microscopie électronique à transmission (MET)

Tous les échantillons ont été préparés et observés avec l'aide de Melina Petrel, ingénieur d'étude au Bordeaux Imaging Center.

1.1. Observation des bactériophages

Un lysat phagique initial de 25 ml, fraîchement produit, est filtré sur membrane PES 0,22 µm puis conservé à 4°C. Le lysat (environ 10^9 UFP/ml) est centrifugé à 20000 *g* (Himac CR22N, Hitachi) pendant 2h à 4°C (Marie-Agnès Petit, communication personnelle) afin de concentrer les particules virales sans altérer leur intégrité, en vue de leur observation. Le culot est soigneusement égoutté et recouvert de tampon phage. Après 30 min de contact, le culot est repris soigneusement par une série d'aspirations-refoulements doux.

La coloration négative des échantillons est obtenue en déposant 10 µl de suspension virale sur une grille cuivre 200 mesh formvar carbone (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis). Après 30 sec de contact, l'excès de liquide est éliminé en inclinant et déposant la tranche de la grille sur papier filtre Watteman N°1. Un volume de 10 µl 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.

*1.2. Observation de cellules d'***O. oeni**

Fixation des cellules

Un volume de 10 ml de suspension bactérienne a été collecté en phase exponentielle de croissance puis centrifugé à 10000 *g* pendant 5 min. Le culot est repris dans 5 ml de tampon cacodylate de sodium à pH 7,2 (0,1M) contenant 2% de glutaraldéhyde (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis). Après 3 h de fixation à température ambiante, les cellules peuvent être conservées dans le fixateur à 4°C. Après centrifugation, les cellules sont lavées 3 fois dans le tampon cacodylate 0,1M pH 7,2. Les cellules sont ensuite inclues dans 1% d'agarose Low Melting Point (Sigma) dans l'eau, et immédiatement centrifugées avant solidification du mélange dans la glace. Le bloc d'agarose obtenu est découpé en bloc de 1 mm^3 maximum à l'aide d'une lame de rasoir et d'une loupe binoculaire. Les découpes sont déposées dans des piluliers remplis d'eau jusqu'à l'étape de post-fixation.

Post fixation

L'eau est retirée des piluliers et les échantillons sont incubés pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité dans la solution de post-fixation : tétroxyde d'osmium 1% aqueux (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis) contenant 1,5% de cyanoferrate de potassium dans du tampon cacodylate 0,1M

pH 7,2. Deux lavages de 5 min dans le tampon cacodylate, suivis de trois lavages dans l'eau sont ensuite effectués.

Les échantillons sont post-fixés avec une solution d'acétate d'uranyle à saturation dans l'eau (~3%), à 4°C pendant 30 min et à l'obscurité. Après rinçage à l'eau, ils sont progressivement déshydratés avec des solutions d'éthanol de concentration croissante (50, 70, 95 puis 100%). Pour finir, deux incubations de 30 minutes dans l'oxyde de propylène sont réalisées.
Pendant ce temps, de la résine époxy fraiche est préparée (Embed 812:22, 5 g, DDSA 18 g, MNA 9 g, BDMA 1,2 g – Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis). Les blocs contenus dans chaque pilulier sont alors imprégnés dans quelques millilitres d'un mélange 50/50 propylène/résine, pendant 2 h à température ambiante puis une nuit, à température ambiante, dans de la résine pure. Le lendemain, le bain de résine pure est renouvelé et l'incubation prolongée de 5 h. L'inclusion finale est réalisée dans des moules de silicone (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis) et la polymérisation s'opère pendant 48 h à l'étuve à 60°C.

Coupes

Les coupes sont réalisées sur l'ultramicrotome Leica EM-UC7 après taille de la pyramide à la lame de rasoir. Les coupes ultrafines sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant ultra 35° 2 mm (Diatome, Suisse), avec une vitesse de coupe de 1 mm/s et une épaisseur d'environ 65 nm. Elles sont récupérées à la surface de l'eau sur des grilles Cuivre 150 mesh (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis) préalablement nettoyées à l'acétone.

Les coupes peuvent alors être contrastées avec de l'acétate d'uranyle. Un mélange v/v d'acétate d'uranyle à saturation dans l'eau avec de l'éthanol 100% est mis en contact avec les grilles pendant 20 min. Plusieurs rinçages sont ensuite effectués : un premier rinçage rapide dans une goutte d'éthanol 50%, puis deux autres de 5 min dans une goutte d'eau distillée. Les grilles sont ensuite séchées sur papier filtre. Puis, les grilles sont incubées dans du citrate de plomb (réactif de Reynolds), pendant 7 min, et rincées à l'eau distillée (2x 5 min). Les coupes sont enfin séchées sur papier filtre et stockées dans des boîtes de Petri.

Détection des polysaccharides

Afin de contraster les polysaccharides, la réaction de PATAg est réalisée sur les coupes ultrafines collectées sur des grilles Or 150 mesh (Electron Microscopy Sciences, Etats-Unis). Les grilles sont

mises en contact avec une solution aqueuse d'acide périodique 1% pendant 20 min. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, les grilles sont placées dans une solution d'acide acétique 20% contenant 0,2% de thiocarbohydrazide pendant 30 min à l'obscurité. Elles sont ensuite rincées dans de l'acide acétique 10% puis dans l'eau. Enfin, elles sont révélées dans un bain de 30 min et à l'obscurité dans une solution aqueuse de protéinate d'argent, et rincées plusieurs fois dans l'eau.

Observation

L'observation se fait ensuite en mode haut contraste, à l'aide d'un microscope électronique en transmission (Hitachi H7650) en haute tension de 80 kV, équipé d'une caméra Gatan Orius 832.

2. Spectre de résistance

Un lysat phagique concentré est titré en parallèle sur la souche propagatrice et sur la souche dont la résistance doit être évaluée. 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.

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 ϕ) à 25 °C. Une culture bactérienne en MRSϕ en phase exponentielle est

diluée de façon à avoir une DO_{600nm} de 0,2. 900 µl de culture sont gardés à 25°C. Le lysat phagique test, préalablement ramené à température ambiante, est ajouté de façon à créer une MOI de 0,01. Ceci représente à ce stade une quantité de phages proche de 4 x 10^6 UFP. Le mélange est immédiatement dilué, en transférant tout le volume dans 9 ml de MRS ϕ (25 °C) puis 500 µl de ce mélange dans 49,5 ml de MRS ϕ. Les cellules infectées ont ainsi été diluées au 1/1000. 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 0,22 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.

VI. Approches moléculaires

1. Extraction d'ADN bactérien

Extraction sur carte FTA® CloneSaverTM

Afin de faciliter l'étape d'extraction, les cartes FTA® CloneSaverTM (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) ont été utilisées.

Le dépôt de 8 µL d'une suspension cellulaire ou d'une colonie bactérienne reprise dans 30 µL d'eau milli-Q est réalisé sur la carte FTA® CloneSaverTM. Cette dernière est constituée d'une membrane traitée chimiquement permettant la lyse cellulaire après 1 h de séchage à température ambiante. L'ADN de haut poids moléculaire reste alors immobilisé dans la matrice.

La carte utilisée contient un indicateur qui passe du rose au blanc lorsque l'échantillon est déposé. 96 échantillons peuvent être déposés par carte et se conservent à long terme à température ambiante et à l'obscurité.

Extraction d'ADN génomique à l'aide d'un kit commercial Wizard Genomic DNA (Promega)

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 µl d'une solution d'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 µl 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 µl de la solution concentrée) et incubée à 37 °C pendant 30 min. Les protéines et autres débris cellulaires sont précipités en ajoutant 200 µl 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 microtube 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*, 5 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 puis repris dans 20 µl d'eau milli-Q autoclavée. L'ADN est réhydraté pendant une nuit à 4 °C avant d'être utilisé ou stocké à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

Extraction d'ADN génomique à partir d'un échantillon de vin

Dans un délai de 24 h après réception, un échantillon de 10 ml de vin est centrifugé (10000 g, 10 min) et le culot est resuspendu délicatement dans 1 ml de TE (pH 8) pour laver les cellules. Après une nouvelle centrifugation (10000 *g*, 5 min) le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 300 µl d'EDTA (50 mM, pH 8) puis transféré dans un tube FastPrep de 2 ml, stérilisé contenant 200 µl de billes de verre (0,1 mm de diamètre). Les échantillons peuvent être placés à -20°C à ce stade, afin de poursuivre l'extraction ultérieurement.

Ensuite, le tube est placé dans l'homogénéisateur à haute vitesse FastPrep (MP Biomedicals) qui va permettre une lyse mécanique des cellules, grâce à 5 cycles de 45 sec à 6,5 m/s. Un temps de repos dans la glace de 5 min entre chaque cycle est observé. La lyse cellulaire est terminée par l'ajout de 300 µl de « Nuclei Lysis solution » et 200 µl de « protein precipitation solution » (kit Wizard Genomic DNA, Promega). Le mélange est agité au vortex pendant 20 sec puis placé sur la glace pendant 5 min, permettant la précipitation des protéines.

Après centrifugation (10000 *g*, 3 min) le surnageant (~ 650 µl) est transféré dans un nouveau tube auquel est ajouté 1/10^{e} (v/v) de Polyvinylpyrrolidone (PVP) 10% (p/v). Le PVP est soluble dans l'eau et va permettre d'extraire les polyphénols, qui sont des inhibiteurs de PCR. L'échantillon est ensuite vortexé 10 sec puis centrifugé (10000 *g*, 2 min). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube contenant 500 µl d'isopropanol à température ambiante. L'échantillon est homogénéisé par retournements puis laissé à température ambiante pendant 15 min pour permettre la précipitation de l'ADN.

Après centrifugation (10000 g, 15 min), le culot est lavé dans 300 µl d'éthanol (70%) puis recentrifugé (10000 *g*, 2 min). Ce culot est ensuite séché puis repris dans 30 µl d'eau milli-Q autoclavée, en présence de RNase (1 µl). L'ADN est réhydraté à 4°C sur la nuit avant d'être utilisé ou stocké à -20°C.

2. Extraction d'ADN phagique

Protocole selon Zinno et al. (2010) pour l'extraction d'ADN des* Siphorividae *(oenophages).

Ce protocole est adapté à l'extraction de l'ADN des phages de BL, en particulier des Siphophages. Un volume de 1 ml de lysat concentré et filtré est additionné de 1 µl de Dnase (1 mg/ml) et 1 µl de RNase (1 mg/ml) et incubé 30 min à 37°C. Un volume de 100 µl de SDS mix (0,25M EDTA; 0,50M Tris-HCl pH 9; 2,5% SDS) est ajouté et l'ensemble est incubé à 65°C pendant 30 min. L'ajout de 125 µl d'acétate de potassium réfrigéré (8M) permet la précipitation des protéines dans l'échantillon maintenu dans la glace pendant 30 min minimum. Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C, la totalité du surnageant est transféré dans un microtube de 2 ml. Un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) est ajouté (50/50, v/v).

Après une nouvelle centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min, la phase supérieure est délicatement transférée dans un nouveau microtube de 2 ml. Un volume égal d'isopropanol est ajouté sous hôte afin de précipiter l'ADN lors d'une centrifugation à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 3 fois à l'éthanol 70 %. Ce culot est ensuite séché avant d'être repris dans 25 µl d'eau milli-Q préalablement autoclavée. L'ADN extrait est réhydraté sur la nuit à 4°C avant d'être utilisé ou stocké à -20°C.

***Protocole selon Sambrook and Russell (2001) pour l'extraction d'ADN des* Siphorividae *et* Tectiviridae**

Le protocole est appliqué à un volume de 25 ml de lysat filtré. Les phages sont précipités par addition de NaCl (1M) et de PEG 6000 (10%, p/v) à 4°C. Après dissolution, le mélange est transféré dans un tube à centrifuger et maintenu à 4°C pendant 12 h minimum, permettant ainsi la précipitation des particules virales.

Une centrifugation à 20 000 *g* à 4°C pendant 30 min est réalisée et le surnageant est éliminé. Le culot est recouvert de 500 µl de tampon phage et le mélange est incubé 30 min à température ambiante. La suspension est transférée dans un microtube de 1,5 ml, et traitée à la DNase (1 µg/ml) et RNase (1 µg/ml) à 37°C pendant 30 min. Une extraction au chloroforme (v/v) permet d'éliminer le PEG résiduel. Après centrifugation (13000 rpm, 10 min), la phase aqueuse est récupérée et additionnée de protéinase K (50 µg/ml), d'EDTA (20 mM) et de SDS (0,5%) et chauffée à 65°C pendant 20 min.

La précipitation des protéines est obtenue par ajout de KCl 0,5M, suivie d'une incubation dans la glace pendant 30 min minimum.

Après centrifugation (13 000 rpm, 15 minutes à 4°C) le surnageant est transféré dans un nouveau microtube et deux extractions successives (v/v) sont réalisées par les mélanges phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) puis chloroforme/alcool isoamylique (24:1).

Ensuite, l'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu suivi d'une incubation de 30 min dans la glace.

Après une centrifugation de 30 min à 13 000 rpm à 4°C, le culot d'ADN est lavé par ajout de 200 µl d'éthanol à 70%, puis centrifugé 15 min à 13 000 rpm. Cette étape est répétée deux fois.

Une fois le surnagant éliminé, le culot est séché pendant 10 min puis repris dans 25 µl d'eau milli-Q autoclavée. L'ADN extrait est réhydraté sur la nuit à 4°C avant d'être utilisé ou stocké à -20°C.

3. Digestion de l'ADN phagique par des enzymes de restriction et recherche d'extrémités cohésives

L'ADN (environ 1 µg) est digéré en présence de 10 unités d'enzyme de restriction pendant 1 h à 37°C. Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur New England Biolabs : *Eco*RI, *Hind*III, *Nde*I, *BamH*I et *Bgl*II. La présence d'extrémités cohésives 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 puis 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.

4. Approches PCR

Design et synthèse des amorces

Le design des différents couples d'amorces est réalisé avec le logiciel primer3 (http://primer3.ut.ee/). Leur synthèse est effectuée par la société Eurofins Genomics.

La liste des amorces utilisées lors de cette étude est présentée dans les **Tableaux XVIII** et **XIX**.

La matrice utilisée en PCR peut être : (i) de l'ADN génomique bactérien (1 ng par réaction), (ii) un prélèvemnt d'une pastille de membrane FTA effectué à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Micro-PunchTM 1,2 mm), lavé dans 200 µl de tampon Tris-EDTA (Tris 1M pH8 1%, EDTA 0,5M pH8 0,5%, eau milli-Q) puis dans 200 µl d'eau milli-Q, (iii) de l'ADN génomique phagique (1 ng par réaction) ou (iv) un lysat phagique concentré (minimum 10^3 UFP par réaction).

Tableau XVIII. Liste des amorces utilisées

Nom	Gène cible ou région amplifiée	Séquence (5' --> 3')	Amplicons (pb)
***Typage d'*O. oeni**			
Oo1	Enzyme malolactique (*mleA*)	GTGCCGCTTTTTTGGATATTA	430
Oo2		AGCAATTTTATCTTTATAGCT	
TR1_f	Lipoprotéine PlpE-like	GGTAAGGGAAAAGTTATCCTCG	268
TR1_r		GTTTTACCTTCGGTCGAGC	
TR2_f	Protéine kinase	CATAATAGAATTCACTTCGCTTACC	563
TR2_r		GTAGCTGGTACGAGCTCTTC	
Détection des oenophages			
IntA_f	Intégrase de type A	CGAAGTTTTGACTGGAAAAGAAA	273
IntA_r		TTGAGCGAAGCTGCTATAAGAAC	
IntB_f	Intégrase de type B	AGTTACCACCAAAGGCCATAAAC	443
IntB_r		GCTCTGACGACTTACCAGCTTTA	
IntC_f	Intégrase de type C	GGCTATGACGCAGGGCGTGG	426
IntC_r		TGACGGGACGTGCTGGCAAG	
IntD_f	Intégrase de type D	CGGAAAATATTATCAAGCACGAG	343
IntD_r		TTCAGCGTGATCTTTACCAAAAT	
Endo_f	Région conservée de l'endolysine chez tous les	GCTTCTAAATGGTCGACTGG	447
Endo_r	les oenophages tempérés	GGCATTTTTTAATCCATTTAA	
Endo_unk_f	Endolysine du phage unk162.1	GAACAGGAAGCACAACGGAG	193
Endo_unk_		ACGCCATCATAAACGACAGC	
LysinL_f	Endolysine du phage X149	TATCCATGCTGCTGGTTGGG	398
LysinL_r		ATCTTTGCACCAACCCACGA	
***Détection de la lysogénie chez* O. oeni**			
JoncA_dF	Jonction *attL* de type A	CTTGATTGGAACTATCCCGA	299
JoncA_dR		AGTGTGGCAAATTTGTGGCA	
JoncB_dF	Jonction *attL* de type B	ACGCATAATAAACTGCTTAAA	278
JoncB_dR		GACTGCGTTTAAGCAAAC	
JoncC_dF	Jonction *attL* de type C	TTTGTTGCGTAAAAAGCAAT	309
JoncC_dR		GACAAGGTCACTGATTTAAT	
JoncD_dF	Jonction *attL* de type D	GTCTAACACTCAGAAGCCGA	393
JoncD_dF		GCAATGAAGATATTTTAGTG	

Tableau XIX. Liste des amorces utilisées pour le typage des oenophages

Nom	Gène cible ou région amplifiée	Séquence (5' --> 3')	Amplicons (pb)
Typage des oenophages de type A			
C1_f	Amplification du 1er type	AAAAGCATGATTTCCCGTTG	241
C1_r	de répresseur putatif	TGGCAATTCTATCAGGCACA	
C2_f	Amplification du 2e type	CAATGGATCAGCTTGCAGAA	193
C2_r	de répresseur putatif	GGTGCATCCATAGCAACTGT	
C3_f	Amplification du 3e type	GAAAATGCAGTTCCCGAAAG	226
C3_r	de répresseur putatif	CGCACGGTTTTATCAAGACA	
Rep1_f	Amplification du 1er type de protéine	TGAACAGTGACGAAAAACGA	505
Rep1_r	de réplication putative	TGCTTTCTCCTCTGTCTTTTCTT	
Rep2_f	Amplification du 2e type de protéine	ATTTGGATTGCCAGACGAAG	221
Rep2_r	de réplication putative	CTTTCGCAAGCTTAGCGTCT	
TerS1_f	Amplification du 1er type de la petite	TGTCAATCCAGTCACGGGTA	206
TerS1_r	sous- unité de la terminase	TGATCTGCTCGGCAGTAGAA	
TerS2_f	Amplification du 2e type de la petite	ACACGCTGGAAGGAAAAGAA	178
TerS2_r	sous- unité de la terminase	TCTTAATTCGGGCACCAAAG	
TerS3_f	Amplification du 3e type de la petite	TTCAAGATTCCACCGGAAAG	169
TerS3_r	sous- unité de la terminase	TCTTTCGGCTGAACGATTTT	
TerS4_f	Amplification du 4e type de la petite	GCCATGTGGAGAAAAATCGT	206
TerS4_r	sous- unité de la terminase	TAACCAGCAAAATCCGTTCC	
Tmp1_f	Amplification du 1er type de	AGCCAACGCAATGGTTAAAA	79
Tmp1_r	« tail length tape measure"	CGCCCATTTCCTTAGTCATT	
Tmp2_f	Amplification du 2e type de	GGTTGGATCGGAAATTGCTA	247
Tmp2_r	« tail length tape measure"	TGCAGCTATGGCTGTAATCG	
Tmp3_f	Amplification du 3e type de	ATGGTCAACACGATCAACGA	183
Tmp3_r	« tail length tape measure"	CGTTACGGCCTGAATTTGTT	
Tmp4_f	Amplification du 4e type de	GCGGGATTGCTGGATTATTA	231
Tmp4_r	« tail length tape measure"	CGAAAATGCTTGCTTTCACA	
Doc_f	Amplification d'une région du gène *doc*	TAACGGCCTTGATAGCGTTT	256
Doc_r	dans le module distal	TTGAGGCATCCTTCCTTCAG	
Typage des oenophages de type D			
9805_1f	Amplification d'une région de l'*orf* 15 du prophage D	ACACCGTTTCGCAGATTTTC	159
9805_1r	de la souche IOEB 9805	ACCATATTTTCCGTGCTGGA	
S13_1f	Amplification d'une région de l'*orf* 15 du prophage D	AGCAGATTTCGACGAGGGTA	160
S13_1r	de la souche S13	ACCGTCATTTAATTCGCGTC	
S11_1f	Amplification d'une région de l'*orf* 16 du prophage D	AATCCGGTTCAGGGAACAAT	177
S11_1r	de la souche S11	GCTGCATTCGTTTAGCAACA	
thsp_f	Amplification de la deletion de 500 pb	TCGACATCGTCCGACATTTA	variable
thsp_r	au niveau du gène de *tail-host specificity*	ATATCGAGCACCCATGAACC	
HP_3f	Amplification de la 3ème région	TTCCAACTAAAGGCCATGTT	variable
HP_3r	des prophages de type D	TTGGATGCCCGTAATTTTCT	
MorDf	Amplification de la région conservée du module distal	CATAATCCACAGCGGACCTT	545
MorDr		TGCTGACCTTTTTGGCTTCT	
Typage des phages unk			
Repunk_f	Protéine de réplication putative	GGCAAGCCTGACAATTCATCA	396
Repunk_r	du phage unk162.1	TAATGCATGCTCCGCTTCAC	
Terunk_f	Protéine de la grande sous-unité de la terminase	CCGTGCCCGTTTATCAAGAG	157
Terunk_r	du phage unk162.1	TACACTCTACCTTGCGCCAA	
MCPunk_f	Protéine majeure de capside	AGCAAACGATGGGGCAAATT	363
MCPunk_r	du phage unk162.1	GAGGTGCGTCATGTTCAGAC	
TMPunk_f	Protéine « tail length tape-measure »	CAAAATATGGCGCTTCGGGA	207
TMPunk_r	du phage unk162.1	TTTCTGCACTTGTCCCGTTG	

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 à 25 µl, avec le kit Taq 5x Master Mix (New England, Biolabs, Evry, France), et 0,2 µM de chaque amorce ont été ajoutés au mélange réactionnel. Un thermocyler i-Cycler (Biorad) a été utilisé pour les réactions d'amplification. Celles-ci se déroulent en 30 cycles, constitués d'une étape de dénaturation de 30 sec à 95°C, une étape d'hybridation des amorces pendant 30 sec à une température comprise entre 50 et 60°C selon le Tm des amorces, et une étape d'élongation à 68°C (1 min pour 1 kb). Les réactions sont précédées d'une étape de dénaturation initiale de 3 à 5 min à 95°C, et d'une étape d'élongation finale à 68°C pendant 8 à 10 min.

Pour amplifier les plus longs fragments de la région variable HP3 permettant de typer les phages D, le kit LongAmp *Taq* PCR (New England, Biolabs, Evry, France) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur.

RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

L'amplification aléatoire de l'ADN phagique, par RAPD-PCR, a été réalisée avec une seule amorce par réaction. Le protocole a été adapté de Gutiérrez *et al.* (2011). Dans le mélange réactionnel, l'amorce RAPD OPA09 (Kit Eurofins, 5'-GGGTAACGCC-3') a été utilisée à la concentration de 10 µM et 1 ng d'ADN de phage a été ajouté. Le mix Taq DNA polymerase (New England Biolabs) a été choisi.

La réaction a été réalisée dans le thermocycler iCycler (Bio-Rad) en suivant les conditions suivantes : 95°C pendant 5 min, 40 cycles à 95°C pendant 30 sec, 46°C pendant 60 sec et 68°C pendant 120 sec, et étape d'élongation finale de 10 min à 68°C.

Migration des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose

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 (100 V) pendant 30 min. Lors de la migration des produits de digestion enzymatique, le voltage est réduit à 85 V et le temps de migration est compris entre 50 et 75 min, sur gel d'agarose 0,8%.

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 *Hind*III, du 100 bp DNA ladder et du 2 Log DNA ladder (0,1-10 kb) tous disponibles chez New England Biolabs.

5. Séquençage des génomes phagiques et outils bio-informatiques

Séquençage et comparaison des génomes de phage

Les phages ont été séquencés au Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (CGFB). Le kit Truseq (Illumina) a été utilisé pour la préparation des librairies et le séquençage a été réalisé grâce au système Miseq (Illumina, en 2 × 250 bp paired-end).

L'assemblage des génomes a été réalisé avec les logiciels Newbler et SPAdes version 3.10.1 (Bankevich *et al.,* 2012). Pour la prédiction des ORFs et leur annotation, nous avons utilisé le server RAST (http://rast.nmpdr.org/) et le logiciel DNAmaster (http://phagesdb.org/DNAMaster/).

Ensuite, la comparaison par alignement nucléotidique des génomes phagiques a été rendue possible par le logiciel EasyFig (Sullivan *et al.*, 2011).

L'étude de génomique comparative a été menée en collaboration avec Fety Jaomanjaka. Les calculs des valeurs d'ANI et de distances tetra ont été réalisés avec Jspecies (Richter *et al.*, 2016). Les arbres phylogénétiques ont été générés avec le logiciel MEGA7 ou grâce à la méthode VICTOR (https://ggdc.dsmz.de/victor.php) en utilisant la Genome-BLAST Distance Phylogeny method (GBDP, Meier-Kolthoff *et al.*, 2017).

Analyses statistiques

Les tests de Student ainsi que le test de corrélation de Pearson ont été réalisés avec le logiciel XLstat.

Résultats

Chapitre I

Mise en évidence de bactériophages dans l'environnement œnologique

Avant-propos

L'Equipe de recherche en Œnologie a participé à l'isolement et à la caractérisation des bactériophages infectant *O. oeni* dans les années 1980-1990, au travers des contributions successives de Montserrat Poblet, Elke Arendt, et Emmanuel Gindreau, sous la direction du Professeur Aline Lonvaud-Funel. Ces études ont conclu à la prévalence de la lysogénie dans l'espèce, source majeure des oenophages. En 2010, les études sur la thématique des oenophages ont repris au laboratoire notamment grâce aux données récentes issues de programmes de séquençage de souches d'*O. oeni.* Ces données ont été exploitées par Fety Jaomanjaka (Jaomanjaka, 2014). Les études de génomique comparative de 36 prophages ont montré leur répartition en quatre groupes (A à D), selon le site d'insertion occupé dans le chromosome bactérien. A chaque groupe de prophages correspond une intégrase, dont la séquence protéique présente une signature particulière. Un ensemble de réactions PCR spécifiques de chaque gène *int* (A à D) a été mis au point. Afin de conforter ses observations, Fety Jaomanjaka a ensuite mené une campagne de recherche d'oenophages libres dans des vins rouges issus de la région de Pauillac. Les 17 phages isolés ont été classés avec succès dans les quatre groupes proposés grâce au schéma PCR mis en place (Jaomanjaka *et al.*, 2013).

L'objectif de ce premier chapitre est d'établir si la diversité existant au sein des oenophages se limite ou non aux groupes définis par Jaomanjaka (2014). Nous avons donc souhaité confronter les données précédemment établies à un nouveau panel d'isolats phagiques, le plus large possible. Pour ce faire, une nouvelle campagne d'isolements a été entreprise, en privilégiant des échantillons d'origines plus diversifiées que celles retenues dans les inventaires passés. La connaissance de la diversité des oenophages est une étape incontournable dans l'objectif de mettre au point des outils, notamment moléculaires, de suivi et de quantification. La mise à disposition de tels outils permettra alors de comprendre la dynamique des oenophages et leur rôle ou impact éventuel au cours de la vinification.

La première partie de ce chapitre décrit la recherche d'oenophages menée à partir d'un panel d'échantillons issus du millésime 2014 qui ont été collectés dans différents domaines du bordelais. Trois types de vins issus de cépages différents ont été ciblés : les vins blanc moelleux et secs (ne réalisant pas de FML) et des vins rouges. La collecte d'échantillons a été réalisée à différentes étapes de la vinification (moût, pied de cuve, FA, FML). L'isolement d'oenophages a été réalisé en appliquant systématiquement deux protocoles à chaque échantillon, nommés recherches « directe » (protocole 1) et « indirecte » (protocole 2). La recherche directe de phages a été réalisée sur l'échantillon filtré.

Pour mener la recherche indirecte, l'échantillon a été incubé au préalable dans du bouillon MRS, puis centrifugé et filtré. Les deux types de lysats ainsi préparés ont été analysés par la technique de la double couche en utilisant la souche IOEB S277 comme hôte. L'approche a permis le dénombrement ainsi que l'isolement des phages à partir des plages présentant des morphotypes distincts. Cette première étude a conduit à l'isolement de 71 phages. Leur typage moléculaire a été réalisé par PCR, en appliquant à chaque lysat les quatre réactions spécifiques des intégrases de type A à D décrites par Jaomanjaka *et al.* (2013). Nos travaux ont montré la présence d'oenophages dans 20% des échantillons, avec des niveaux de population variant de 10 à 10^7 UFP/ml. Deux autres éléments originaux ressortent de cette étude : la prévalence des phages dans le moût (20 phages/71), ainsi que la démonstration de l'existence d'un nouveau groupe homogène, nommé « unk », rassemblant 33 des 71 nouveaux phages isolés. Ils ont la caractéristique de ne pas répondre aux PCR spécifiques des groupes A à D, et partagent des profils RAPD similaires. Ces travaux sont rassemblés dans un article publié dans la revue *International Journal of Food Microbiology* (page suivante).

Etant donné notre objectif d'accéder à la diversité des oenophages, le dispositif de collecte sur le millésime 2014 a privilégié la diversité en termes de domaines, de types de vins et d'étapes. Si l'on considère la fabrication dans sa globalité, les échantillons ont été prélevés de façon ponctuelle au cours des procédés, et très peu de suivis cinétiques ont été réalisés. Par ailleurs, la seconde caractéristique du dispositif « millésime 2014 » a été que le déroulement de la FML a été globalement favorable dans les domaines ayant contribué à l'étude. Seuls deux vins en échec de FML ont été réceptionnés. Cet élément limite donc l'établissement de liens entre la présence d'oenophages et les difficultés de FML. Enfin, la lourdeur du dispositif expérimental a parfois nuit au traitement immédiat des échantillons post-collecte. Pour toutes ces raisons, nous avons reconduit une campagne de collecte sur le millésime 2015. Un ensemble de 131 échantillons ont été prélevés à partir de 7 domaines réalisant des vinifications en rouge ou en blanc, et une attention particulière a été portée à la rapidité de leur traitement. Les analyses et commentaires sont rassemblés dans la seconde partie de chapitre.

En marge de la recherche centrée sur les oenophages, nous avons également orienté nos recherches vers les phages actifs sur d'autres espèces d'intérêt en vinification. Notre choix s'est porté sur le groupe des bactéries acétiques (BA), responsables de la piqûre acétique des vins. Leur caractérisation, peu documentée à ce jour, pourrait apporter un nouvel éclairage sur la persistance des BA au cours des fermentations (*via* une contribution éventuelle des prophages), ou bien orienter vers le développement de nouvelles approches de réduction des BA, à partir de phages virulents

et/ou d'endolysines phagiques. Notre première tentative a mené à l'isolement du phage GC1, actif sur plusieurs souches de l'espèce *Gluconobacter cerinus*. Comme les phages infectant les BL, GC1 est un virus à ADN double brin. Cependant, il est affilié à une famille différente, les *Tectiviridae*. Son isolement et sa caractérisation font l'objet d'un article soumis à la revue « *Viruses* », présenté en fin de chapitre.

Partie I. A survey of oenophages during winemaking reveals a novel group with unusual characteristics.

International Journal of Food Microbiology 257 (2017) 138–147

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics

Cécile Philippe[a], Fety Jaomanjaka[a,b], Olivier Claisse[a,c], Rémi Laforgue[a,d], Julie Maupeu[a,d], Melina Petrel[e], Claire Le Marrec[a,b,*]

[a] Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de recherche Oenologie, F-33882 Villenave d'Ornon, France
[b] Institut Polytechnique de Bordeaux, ISVV, EA 4577 Oenologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
[c] INRA, ISVV, USC 1366 Oenologie, F-33882 Villenave d'Ornon, France
[d] MICROFLORA, ISVV, EA 4577 Oenologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France
[e] Univ. Bordeaux, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-US4 INSERM, Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Bacteriophage
Diversity
Wine making
Must
Oenococcus oeni
Malo-lactic fermentation

ABSTRACT

Oenophages have so far been mostly isolated from red wines under malolactic fermentation (MLF), and correspond to temperate or ex-temperate phages of Oenococcus oeni. Their genomes are clustered into 4 integrase gene sequence groups, which are also related to the chromosomal integration site. Our aims were to survey the occurrence of oenophages in a broader and more diverse collection of samples than those previously explored. Active phages were isolated from 33 out of 166 samples, which mostly originated from must and MLF. Seventy one phage lysates were produced and 30% were assigned to a novel group with unusual genomic characteristics, called unk. All unk members produced similar RAPD and DNA restriction patterns, were negative by PCR for the signature sequences previously identified in the integrase and endolysin genes of oenophages, and lacked any BamHI restriction site in their genome. The data support that development of additional and novel signature genes for assessing oenophage diversity is now required.

1. Introduction

There's a large consensus in the scientific community that quality and identity of wines will benefit from a better knowledge of the bacterial, yeast and fungal communities associated with soils, grapes and products during fermentation. The unveiling of microbiote and its dynamics during wine making is expected to help in the identification of the ecological factors and farming systems that explain the biodiversity, and guide practices to avoid wine quality depreciation. Culture-dependent diversity surveys have been reported worldwide (Barata et al., 2012; Capece et al., 2013; Martins et al., 2012; Nisiotou et al., 2011; Renouf et al., 2007) and recent metagenomic analyses now offer a more complete picture of these communities (Bokulich et al., 2012; Piao et al., 2015; Pinto et al., 2014; Portillo et al., 2016; Zarraonaindia et al., 2015). Wine microbial consortia can be viewed as a dynamic world of interactions and some links have been recently observed between vineyard environmental conditions and microbial inhabitation patterns (Bokulich et al., 2014; Liu et al., 2017).

Molecular inventories of the grape-surface microbiota have recently demonstrated an unexpected diversity of eubacterial communities. Among them, discriminant populations of Acetobacteraceae and Lactobacillales represent sources of quality variation, being important organisms in wine spoilage (Bartowsky, 2009) and the latter in malolactic wine fermentations (MLF) (Bartowsky and Borneman, 2011; Lonvaud-Funel, 1999). Apart from these characterizations, very few data do consider phages are actors of the community, although they are an ubiquitous feature of prokaryotic existence (Clokie et al., 2011). Yet, examples from other ecosystems show that natural bacteriophage populations may play a role in shaping bacterial populations and communities as obligate parasites, vectors of horizontal gene transfer, drivers of bacterial evolution and mediators of competition among species (Koskella and Brockhurst, 2014). The magnitude and variability of phage populations during wine making remain so far unexplored, and substantial progress is needed to adapt the experimental designs to capture the whole viral community.

The few available data on phages of oenological origin have been obtained in the 1980s and 1990s and are restricted to phages infecting lactic acid bacteria (LAB), in relation with the capacity of some species to conduct MLF. The process, which reduces acidity and increases microbial stability, is largely driven by Oenococcus oeni, which is the best

* Corresponding author at: EA OEnologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) (Université Bordeaux – Bordeaux INP), 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.
E-mail address: clehenaff@enscbp.fr (C. Le Marrec).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.014
Received 11 December 2016; Received in revised form 14 June 2017; Accepted 15 June 2017
Available online 17 June 2017
0168-1605/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

adapted species to the harsh conditions prevailing in wine (Lonvaud-Funel, 1999). Several studies investigated the presence of phages infecting O. oeni (or oenophages) in wine as it could offer alternative explanations to the delayed or stuck fermentations that are often encountered by winemakers. Pioneering studies mostly targeted red wine samples under spontaneous MLF, and numerous temperate phages infecting O. oeni were isolated (Arendt et al., 1990, 1991; Arendt and Hammes, 1992; Cazelles and Gnaegi, 1982; Davis et al., 1985; Huang et al., 1996; Nel et al., 1987; Poblet-Icart et al., 1998; Santos et al., 1998; Sozzi et al., 1976, 1982). However, their genetic and biological diversity remained largely unexplored and most were not subsequently characterized beyond their description by electron microscopy, and lytic spectra. Interestingly, the sensitivity of some isolated oenophages to low pH, ethanol and other components added to wine (such as bentonite) was demonstrated suggesting a rapid inactivation of phage particles in wine (Henick-Kling et al., 1986). Other authors also pointed out the high diversity of indigenous strains associated with spontaneous fermentation that can carry on the malolactic conversion (Ribéreau-Gayon et al., 2005) and suggested that a natural bacterial strain rotation may occur. Phage lysis of one part of the population would therefore not impact the overall malolactic conversion, as other strains may compensate the destruction and accomplish this task. In the absence of known incidents involving bacteriophages in the wine industry, phage load was considered as not representing a significant risk of fermentation failure during wine making, and studies with oenophages were not pursued during the last 20 years.

Recently, there has been some renewed interest in the characterization of prophages following large-scale sequencing of isolate genomes. Lysogeny was confirmed to be rather frequent in the species (Borneman et al., 2012; Jaomanjaka et al., 2013), in agreement with previous studies showing a frequency of 45–60% of O. oeni strains reported to be lysogenic (Arendt et al., 1992; Poblet-Icart et al., 1998). Prophages in O. oeni were shown to be incredibly varied in their properties, from host range, genetic content to persistence capacities (Borneman et al., 2012; Doria et al., 2013; Jaomanjaka et al., 2013, 2016) making classification a complex task. Genome sequences of oenococcal temperate phages are clustered into four groups, which are related to the chromosomal integration site (Ballestra et al., 2011; Borneman et al., 2012; Jaomanjaka et al., 2013). Integrase gene polymorphism was observed, and conserved sequences were identified in the integrase genes from each group. A PCR typing method was proposed and proved to be helpful in our laboratory to rapidly assess the genetic diversity of oenophages isolated either from wine samples or following induction of lysogens (Jaomanjaka et al., 2013). The selected sequences were also recently amplified from phage lysates obtained after UV induction of lysogenic strains collected from Piemont typical wines (Costantini et al., 2017).

All such recent advances now open new doors toward a better assessment of phage diversity and ways in which oenophages may influence their host's evolution and population dynamics. More studies are also needed when considering the growing trends of using MLF starters. The question as how phage predation may be integrated during selection, stabilization and use of commercial strains is still far from being straightforward. Because of their repeated use, bacteriophage attack could become problematic and could delay MLF and/or open the way for less desired, indigenous populations to dominate (Mills et al., 2005). On another hand, several commercial strains were recently shown to harbor prophages, which may be a source of phages during fermentation. However, as observed in other environments, lysogenic strains may not always result in detrimental consequences and the possibility that prophages have impact on the properties of their host may be of great interest for strain design.

The objective of our study was to extend the search of oenophages to different types of wines, geographical origins and steps during wine making. Interestingly, some newly-isolated phages did not respond to any of the signature sequences previously identified in the integrase and endolysin genes of oenophages and we posit that they form a new group. Together, our results reveal that diversity is higher than previously expected and that additional signature genes may be required for examining phage diversity in O. oeni.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The strain O. oeni IOEB-SARCO 277 was used in this study. It was previously identified as not containing endogenous phage (Jaomanjaka et al., 2013). The strain was grown in liquid or solid MRS (Man Rogosa and Sharpe) (Difco, Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) adjusted to pH 4.8 at 25 °C.

2.2. Collecting of wine samples

A total of 166 samples of oenological origin were collected from different wine estates located in the Bordeaux area, including the Institute of Vine and Wine Sciences of Bordeaux (ISVV) where an in-house vinification trial was conducted. Our survey encompassed 11 distinct appellations. Samples were collected during the vinification of red, dry white and sweet Bordeaux (Sauternes) wines during the 2013 and 2014 vintages, and corresponded to distinct grape varieties. It should be noted that sweet wines from Sauternes (botrytized wines) do not naturally undergo MLF. Detailed information is provided in Table 1 and in supporting online material (Table S1).

Total samples were taken during alcoholic fermentation, or AF (n = 91), malolactic fermentation, or MLF (n = 24) and also during ageing or in bottles (n = 21). The early steps of wine making also received a particular attention with the collecting of samples from must (n = 17), "pieds de cuve" (PDC, see below for details) or juices (n = 13).

The AF steps were driven using powdered or wild yeasts. When indicated, the traditional method of 'pied de cuve' (PDC) was used. It consists in collecting some riped and healthy grapes a few days before harvest in order to propagate indigenous or selected yeasts. The PDC is then inoculated in the vat to promote alcoholic fermentation. MLF were mostly driven by endogenous LAB, and the few cases where starters were used are indicated in Table S1. Different vats were occasionally collected at a same step in a given estate. Such samples corresponded to different conditions (aeration; spontaneous versus inoculated fermentation). Details are given in Table S1.

A total of 47 samples were punctual samples and traceability was only available at the level of the appellation. They included some samples collected during ageing as well as from bottles (Table 1). For the remaining 119 samples, traceability information was provided and included the identity of the estate (numbered A to S), type of wine, vinification step (must; PDC; AF or MLF) and presence of sulfites on grapes post-harvest. Fermentation progress was daily followed by density determinations.

A total of 114 of 119 samples were provided by 15 estates (A to O) which were chosen for kinetic analyses. Five additional estates (P to S) provided a unique sample.

Of note, information collected from winemakers indicated that all MLF were successful except for samples 148 and 149, which showed a delayed fermentation, and sample 163, for which a stuck fermentation was observed despite the inoculation of a commercial starter to trigger MLF.

All samples were stored at 4 °C before use.

2.3. Isolation of phages and purification

We used two distinct protocols in parallel. In protocol 1, samples were centrifuged (5000 × g, 10 min) and filtered. The 0.2 μm membrane filters made of polyether sulfone allowed most free phages to

Table 1
Global survey of oenophages in 166 samples of oenological origin.

Estate[a]		Step[b]											
Sample	Appellation/grape var.	Juice	PDC	Must	AF				MLF		Ageing	Bottle	Pos/tot
					Start	Mid	End	PRO	Start	End			
A	Bordeaux/Sauvignon white	1[S]				4,5,6,7,8,9,10,11							0/9
B	Entre-deux mers/Merlot			61			122						0/2
C	Bordeaux/Merlot						132		133,134,135,136				1/5
D	Lussac Saint Emilion/Merlot	17[S]	22[S],23[S] 24[S],25[S]				78,79,80,81,82,83						0/11
E	Lussac Saint Emilion/Sauvignon /Merlot		31	30	34,35,36,37,38,39		108,109,110,111, 112,113						0/14
F	Lussac Saint Emilion/Merlot				44,45,46,47,48,49,50	51,52,53,54,55,56	72,73,74,75,76,77						0/19
G	Saint Emilion/Merlot			62			124			161			0/3
H	Pomerol/ Merlot / Cabernet Sauvignon						85,86,87,88 89	139,140,141,144	145,146,147,144 143				0/12 1/2
I	Sauternes/Sémillon			67,68 69,70			119,121,126,138						4/8
J	ISVV/Cabernet Sévignon				84	114	120						0/3
K	Bordeaux white/Sauvignon white	2	26		27,28,29	64,65,43							1/8
L	Bordeaux/Merlot			115,116			117,118						0/4
M	Saint Emilion/Merlot	3	16	18	19,20	40,32	71,57						0/9
N	Sauternes/sémillon dry		12				13						1/2
O	Sauternes/Sauvignon white		14		15	21							0/3
P	Sauternes/Sémillon Muscatelle			162									1/1
Q	ISVV/Carménère									163*			1/1
R	Sauternes/Sauvignon			164									1/1
	Sauternes/Sémillon			165									1/1
S	Bordeaux/Merlot			166									1/1
B) Traceability to the appellation and grape variety													
na	Saint Emilion/Cab Franc			125		33	41,42,123,131					127,128, 129	5/9
na	Margaux			63			58,59,60						0/4
na	Pauillac/Cab Sauv-Merlot						66, 130				90,91,92,93,94,95, 96,97,98,99,100, 101,102,103,104, 105,106,107		2/20
na	Sauternes-Sauvignon			137									1/1
na	Gers / Gamay /Merlot								148* 149*				2/2
na	Médoc/Cab Sauv-Merlot								150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160				10/11
	Total		30				91		24		18	3	

[a]Estates are named from A to S; na, non-available;
[b]166 samples were collected at different steps and positive samples are underlined. Last column indicates the number of positive samples/total number analyzed; PDC, pied de cuve; AF, alcoholic fermentation; MLF, malolactic fermentation; PRO, post running-off; *delayed or stuck MLF; [S] presence of sulfites. Wine processes where MLF does not naturally occur are indicated with a slash mark.

pass, while the temperate phages in lysogenic bacteria were removed (Muniesa et al., 2005). In protocol 2, unfiltered samples were inoculated into 10 mL of MRS broth (10% v/v) supplemented with 0.1 mg/mL pimaricin, an antimycotic compound killing yeasts, moulds and other fungi. Assays were incubated for 5 days at 25 °C, centrifuged and filtered. Since MRS was not seeded by O. oeni sensitive strains, incubation only allowed the growth of indigenous strains present in the samples. Among them, sensitive strains could be infected by free phages while natural lysogens were likely to release prophages. Both phenomena were expected to contribute to an increase in phage density.

All samples were stored at 4 °C. The phages were enumerated on the indicator strain O. oeni IOEB-SARCO 277 using the classical double-layer plating technique described by Jaomanjaka et al. (2013, 2016), on MRSΦ agar (MRS supplemented with $MgSO_4$ 3.75 g/L and $CaCl_2$ 2.375 g/L). The top agar solution was similar to regular agar medium except that the agar concentration was 6 g/L rather than the usual 20 g/L used for bottom agar plates. A mixture of a mid-log culture of the indicator strain (0.2 mL at OD_{600} 0.2–0.3) and 100 µL of samples (or dilutions thereof) were added in 5 mL of molten soft-agar and poured on a bottom MRSΦ plate. Detection limit of direct plaque assays was 10 plaque-forming units per mL (PFU/mL). Plates were incubated at 25 °C for 4 to 7 days before examination of plaques. Plaque morphology types were established on the basis of size (small, medium, large), clarity (turbid, clear), and edges (sharp or diffuse) of plaques. Isolated plaques on plates of each sample were examined, and the maximum number of plaque morphological classes produced by the sample was determined. Plaques were picked, suspended in 0.5 mL of sterile MRSΦ medium and stored at 4 °C. They were propagated on the same strain and plaques picked again. This step was repeated twice to ensure purity.

To obtain high-titers phage lysates, the soft-agar method described by Fortier and Moineau (2009) was used. Briefly, enumeration of the initial phage suspension was done as previously described. The dilution of phage yielding confluent lysis was determined and ten confluent lysis plates were prepared using this specific dilution of lysate. After incubation, soft agars were scraped off the plates with a spatula and transferred to a sterile tube and let stand for 30 min at room temperature to allow phages to elute from the soft-agar. The sample was centrifuged, and the supernatant was filtered. Phage titers ranging from 10^6 to 10^{10} PFU/mL were obtained and stored at 4 °C until use.

2.4. Concentration of phage and transmission electron microscopy

The lysate (10^9 PFU/mL) was treated with DNase I (1 µg/mL; Invitrogen, Illkirch, France) and RNase A (1 µg/mL; Promega, Charbonnières, France) at 37 °C for 30 min. Polyethylene glycol (PEG) precipitation was carried out as follows. Sodium chloride (final concentration, 1 M) and PEG 6000 (10% w/v) were added to the treated lysate. The sample was stored overnight at 4 °C and sedimented 10 min at 11000 × g at 4 °C. The pellet was carefully washed twice in TM buffer (50 mM Tris-HCl, $MgSO_4$ 10 mM), and resuspended in a small volume of the same buffer resulting in a 25 fold concentration. The sample was next washed with chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (v/v). Phages (10 µL; ~ 10^{10}/mL) were deposited on carbon-coated copper grids for 30 s, and colored with uranyl acetate (saturated in water, pH 4.5 for 30 s). Stained particles were examined with a Hitachi H7650 electron microscope operated at 80 kV.

2.5. Extraction of phage DNA and restriction digestion

A purified lysate (12 mL) was subjected to ultracentrifugation at 20000 × g for 2 h (Beckman ultracentrifuge, SW32 rotor). The phage pellet was resuspended in 500 µL of TM buffer. Phage DNA was purified using the phenol chloroform method described by Sambrook and Russell (2001) and resuspended in 50 µL of Tris-EDTA buffer (pH 7.6). Phage DNA was quantified by optical density at 260/ 280 nm with a Biospec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Columbia, USA). DNA was digested with the restriction endonucleases EcoRI, HindIII, NdeI and BamHI under the conditions recommended by the manufacturer (New England Biolabs, Evry, France). Restricted DNA was electrophoresed on 0.8% (w/v) agarose gels in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), and visualized by UV photography after staining with ethidium bromide. The 100 bp DNA ladder (M1), Lambda DNA digested with HindIII (M2) and 2-Log DNA ladder (M3) (New England Biolabs, Evry, France) were used as markers. The size of the phage genome was estimated by summing up of the lengths of restriction fragments.

2.6. Phage typing

A Biorad i-Cycler was used for the amplification reactions, which were achieved in a 25 µL volume using the Taq 5× Master Mix kit (New England, Biolabs, Evry, France) and 0.2 µM of each primer. The phage DNA released by heat lysing of particles (10^3 PFU per reaction) served as template for PCR (Jaomanjaka et al., 2013). All 71 lysates were first submitted to a control PCR using malolactic enzyme gene targeted primers (Divol et al., 2003). Absence of amplicon was considered as an absence of contaminating bacterial DNA in the phage sample. Each lysate was subsequently typed using four PCR tests that distinguish the A, B, C and D groups among oenophages, based on their integrase (int) sequence. Phage lysates were also tested using two PCR assays targeting a short conserved sequence in the endolysin (endo) gene (sequences have been reported in Jaomanjaka et al., 2013). To date, all inducible prophages as well as the free replicating oenophages isolated from enological samples by Jaomanjaka et al. (2013, 2016) have yielded an amplicon with the primer couple endoF/R (447 bp), or alternately with the couple endoF/R′ (449 bp).

When a sample produced a negative signal with int and endo-primers, confirmation was obtained through a second PCR amplification where particles were replaced with 0.5 µL of template DNA (50 ng). Phage DNAs were also analyzed by RAPD-PCR, using the OPA9 oligonucleotide primer (5′-GGGTAACGCC-3′) at a final concentration of 10 µM. The cycling program consisted of a single step of 2 min at 94 °C followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 20 s at 45 °C and 2 min at 68 °C, and a final elongation of 10 min at 68 °C. Chromosomal DNA of strain IOEB277 used to propagate the phages was used as a negative control.

All oligonucleotides were purchased from Eurofins MWG-Operon (Munich, Germany).

3. Results

3.1. Phage recovery from samples of enological origin

A total of 166 samples were obtained from local wineries located in different geographic areas of Aquitaine between August 2013 and November 2014. The strategy for collection of samples was based on sampling red, sweet or dry white wines at relevant steps (must, AF, MLF) of the fermentation process. Our objectives were to recover the free phages infecting O. oeni present in the samples, as well as those resulting from the spontaneous induction from endogenous strains. To this purpose, samples were screened for the presence of phages after filtration (protocol 1) and following incubation in MRS and then filtration (protocol 2). Strain IOEB277 was used as the indicator strain due to its sensitivity to all oenophages so far isolated in our laboratory (Jaomanjaka et al., 2013, 2016).

The proportion of samples that tested positive for phage was 20% (33/166) (Table 2). Only one third of the samples (n = 13) yielded plaques with the two protocols used. We also observed that 45% (n = 15) yielded plaques with the direct isolation protocol only, while incubation of the sample in MRS before phage screening was necessary to visualize plaques for 5 additional positive samples. Oenophages were associated with different types of wines (red, dry white or sweet) (Table 2). No phages were found in samples collected from wineries located in Lussac Saint Emilion (n = 44; 3 estates), Entre-Deux-Mers

Table 2
Isolation and molecular typing of oenophages from 33 positive samples

Characteristics of the 33 samples (N, number; wine type; appellation; grape variety; estate and step) are indicated: PDC, pied de cuve; AF, alcoholic fermentation; MLF, malolactic fermentation; Sauv, Sauvignon; Cab, Cabernet; na, identity of the estate non available. The presence of oenophages was assessed by using two protocols (1 and 2). Samples which failed to yield plaques with one protocol (1 or 2) are boxed in grey. Numbers of distinct plaque morphotypes (PM) observed during isolation are given (none, 1, 2, 3 or 4). A total of 71 plaques was collected and purified. Concentrated phages lysates were produced and the newly-isolated phages were typed using a PCR protocol that distinguishes four different groups (Int groups A, B, C or D) among oenophages, based on their integrase gene sequences (Jaomanjaka et al., 2013). Phages yielding no amplicon were called unk, for unknown.

*The lysate initially contained a C- and B-type phage.

Characteristics of the samples					Characteristics of the isolated phages				
N	Wine	Appellation - grape variety	Estate	Step	Total number of PM isolated	Protocol 1		Protocol 2	
						N of distinct PM	Int group	N of distinct PM	Int group
67	Sweet white	Sauternes - Sémillon	I	Must	2	1	unk	1	unk
68					1	1	unk	none	-
69					3	2	unk	1	unk
70					3	2	unk	1	unk
137		Sauternes-SauvBlanc	na		1	1	unk	none	-
164					1	1	D	none	-
162		Sauternes-Sémillon/Muscatelle	P		1	1	unk	none	-
165		Sauternes-Sémillon	R		1	1	D	none	-
125	Red	Saint-Emilion-CabFranc	na		4	1	A	3	A
166		Bordeaux-Merlot	S		1	none	-	1	A
2	Dry White	Bordeaux-SauvBlanc	K	Juice for PDC	2	none	-	2	D
12		Bordeaux-Sémillon	N	PDC	2	2	unk	none	-
135	Red	Bordeaux - Merlot	C	MLF	1	none	-	1	A
143		Pomerol - CabSauv	H		1	none	-	1	A
148		Gers-Gamay	na		4	none	-	4	A (2), B (2)
149		Gers-Merlot	na		2	none	-	2	B; C*
150		Médoc-CabSauv/Merlot	na		1	none	-	1	unk
151					3	2	unk ; A	1	A
152					1	1	A	none	-
153					3	2	unk, A	1	unk
154					2	2	A	none	-
155					3	1	unk	2	A
156					2	1	unk	1	A
157					3	3	unk, A, D	none	-
158					2	1	unk	1	unk
160					3	3	unk (1); A (2)	none	-
163		Bordeaux-Carménère	Q		2	1	A	1	A
131		Saint-Emilion-CabSauv	na	AF	5	2	unk; A	3	unk (1); A (2)
130		Pauillac- CabSauv/Merlot	na		2	2	unk; A	none	-
107				Ageing	2	2	unk	none	-
127		Saint-Emilion-CabSauv/Merlot	na	Bottle (2000	3	3	Unk, A, D	none	-
128				Bottle (2011)	2	2	A; unk	none	-
129				Bottle (2012)	2	2	A; unk	none	-

(n = 2; one estate), Margaux (n = 4; one estate), and Pomerol (n = 12; one estate). Absence of phages may be related to the reduced sampling size, and a broader set of samples from distinct estates is now needed to draw any accurate conclusion.

Samples were collected from different wineries at relevant steps of the process: must (n = 30), AF (n = 91), MLF (n = 24), ageing (n = 18) or in bottles (n = 3). Some noteworthy points follow. First a total of 12 out of the 30 samples collected at the very beginning of the wine-making process (must, juice, PDC) were positive for plaques (Table 1). Most of these samples did not contain sulfites and this may explain the success of the recovery. Accordingly, we could demonstrate that no phage was recovered after one of the samples (166) was added with sulfites (5 g/hL) in the winery, thus confirming the antiviral activity of SO_2 (Henick-Kling et al., 1986). Next, although sampling sizes were different at each step, we observed that phage recovery was less successful during AF and ageing. In particular, despite the large number of samples collected during AF, the diversity of the estates providing them, and the choice of several sampling times during AF, only two samples collected during red wine making (130 and 131) were found positive. Of note, they were taken at the end of AF, and the possibility that MLF had already started may not be excluded.

3.2. Enumeration of oenophage populations

Population densities of oenophages were measured in the 33 positive samples. Phages were found at low levels in 28 samples, with values ranging from 10 to 80 PFU/mL, regardless of the protocol used and origin of the samples. Populations were slightly higher in two must samples collected during the process of sweet (5.5×10^3 PFU/mL) and dry white wine (8×10^3 PFU/mL) (Table S1).

Information given by winemakers indicated that all the 30 above-mentioned samples were associated with fermentation processes which did not suffer from any delay, or development of undesirable microbiota. In contrast, phage titers were found to be significantly higher in the three remaining positive samples (148, 149 and 163). They all corresponded to red wines which were sent to our laboratory for analysis because of a significant delay in MLF. Sample 163 was obtained from a stuck MLF during an in-house trial conducted at ISVV Bordeaux, and yielded titers of 2.2×10^4 PFU/mL and 5×10^8 PFU/mL with protocols 1 and 2, respectively (Table S1). MLF did not proceed even-though a commercial starter had been inoculated, and a second curative inoculation also failed. The phage lysate obtained from the tank was shown to be active against the commercial strain used. Samples 148 and 149 were made from two distinct grape varieties (Gamay and Merlot, respectively) from the Gers appellation. Phage populations were significantly higher (8×10^6 PFU/mL and 1.3×10^7 PFU/mL, protocol 2) compared to other phage-containing-red wines which completed MLF (< 10 PFU/mL). Enumeration of LAB demonstrated that their concentration was below 10^4 CFU/mL and was therefore not sufficient to trigger MLF, since the bacterial concentration required to achieve optimal degradation of malic acid is usually around 10^6 – 10^7 CFU/mL (Lonvaud-Funel, 1999).

3.3. Isolation and molecular typing of oenophages

All 33 positive samples were examined for plaque morphology. Ten samples yielded a unique plaque morphotype. For the 23 remaining samples, 2 to 5 plaques that clearly differed in size and aspect were readily distinguished on the initial isolation plates obtained with protocol 1 and/or 2 (Fig. 1; Table 2). All plaque morphotypes were recovered to account for the possibility that different oenophages were present in a single sample. A total of 71 lysates were produced and phage particles PCR reactivity with int-specific primers was assessed according to Jaomanjaka et al. (2013). As seen in Table 2, 40 out of the 71 newly-isolated phages were classified as members of one of the four previously described int groups: A (n = 30), D (n = 6), B (n = 3) and C (n = 1). Interestingly, the lysate containing the unique member of the C group was also found to contain a B-type phage. Following an additional subculture, we could produce a pure lysate of the B-type phage deprived of the C one. In contrast, repeated subcultures were needed to obtain a pure lysate containing the C phage.

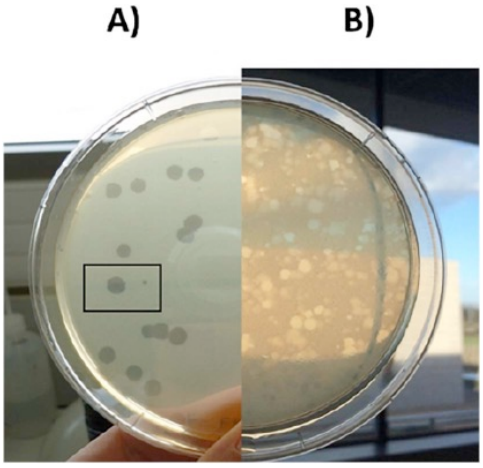


Fig. 1. Examples of plaque morphotypes observed on O. oeni IOEB277
Distinct morphotypes observed in sample 70 (sweet wine, Sauternes) with protocol 1 (A) and sample 148 (red wine, Gers) with protocol 2 (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Surprisingly, the 31 remaining newly-isolated phages had unusual characteristics, since their viral DNA did not contain any of the identifiable sequences conserved in the integrase, nor in the endolysin genes of oenophages (Jaomanjaka et al., 2013, 2016). Same results were obtained when phage particles were replaced with extracted DNA as the template for PCR amplification. The newly isolated phages which are sufficiently divergent to prevent recognition by PCR were further called unk, for unknown.

3.4. Unk phages form a novel group with unusual genomic characteristics

To compare the 31 newly-isolated unk bacteriophages, various restriction endonucleases (BamHI, EcoRI, HindIII, NdeI) previously shown to restrict the genomes of oenophages were used. On the first hand, we observed that none of the unk genomes was cleaved by BamHI (Fig. S1). On the other hand, all unk phages yielded profiles similar to each other using EcoRI (Fig. S1), HindIII and NdeI (data not shown). Of note, all 31 phage DNAs also produced closely related DNA restriction patterns in RAPD amplification (Fig. S1). Altogether, our results suggest that the 31 isolated unk phages are genetically very similar, and belong to a single group.

We next assessed whether unk and other oenophages could also be distinguished by their genome size and particle morphology. Since no oenophage has been isolated from grape must before, phage unk67.1 was chosen as the representative of its group, and characterized in more details. Based on the sizes of the fragments produced by digestion with EcoRI, NdeI and HindIII, unk67.1 DNA was estimated to have 42.5 ± 0.2 kb, which is consistent with data by Jaomanjaka et al. (2013) (Fig. 2). Transmission electron microscopy revealed an icosahedral capsid with a long, flexible and non-contractile tail, indicating that this phage belongs to the Siphoviridae family, a characteristic shared with all oenophages described so far (Fig. 2). The fact that unk67.1 (like other unk phages) produced clear plaques prompted us to assess its ability to lysogenize O. oeni IOEB277 by using the protocol described by Jaomanjaka et al. (2016). All our attempts to isolate lysogenic derivatives were unsuccessful suggesting that unk67.1 is a lytic oenophage.

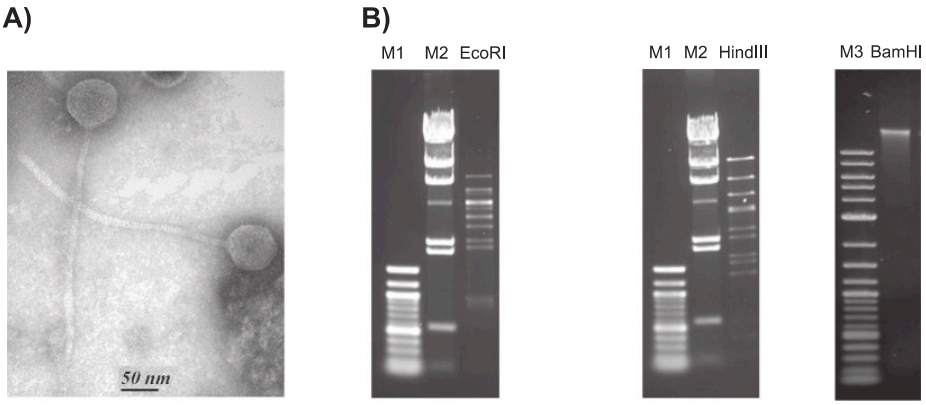


Fig. 2. Preliminary characterization of phage unk67 isolated from Sauternes must.
A) Transmission electron microscope of phage unk67. Phage displayed a head diameter of c. 70 nm with long tails of c. 300 nm.
B) Agarose gel show the DNA fragments obtained by digestion of viral DNA with the restriction enzymes EcoRI, HindIII and BamHI. M1, 100 bp DNA ladder; M2, λ DNA-HindIII digest; M3, 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs, Evry, France).

3.5. Phage richness in samples and prevalence of the O. oeni phage-types

Through molecular typing of oenophages, we could demonstrate the co-existence of distinct phages belonging to at least 2 to 3 genetic groups in 13 samples (Table 2). The samples with highest number of phage types (richness) were all associated with red wine making processes, and harbored distinct combinations: unk and A (9 samples), unk, A and D (3 samples), A and B (1 sample) and B and C (1 sample). Our findings also shed some light on the prevalence of unk phages, being detected in 64% of the positive samples (21 out of 33). In comparison, A-, D- and B- related phages were isolated from 57%, 15% and 3% of the positive samples (19 out of 33), respectively. It is both striking and surprising that A and B group phages were associated with red wine making in our study, while unk and D phages were associated with all types of processes (sweet, white and red). Unk, A and D phages were isolated during most steps along fermentation (must, PDC, MLF, AF and ageing).

4. Discussion

The overall objective of the study was to uncover the abundance and diversity of phages infecting the LAB O. oeni during wine making. Our data provide some clues as to how the choice of the protocol affects phage recovery. The isolation of numerous oenophages also provided the opportunity to better characterize phage diversity and to investigate the reliability of the existing PCR classification scheme based on integrase gene polymorphism in their typing (Jaomanjaka et al., 2013). This work also allowed a first insight into the distribution of phages along fermentation in wineries. Each of these three specific points will be discussed in the following paragraphs.

We used the traditional means of characterizing phage environmental diversity which involve phage culturing of plaque assays, and consequently, only infectious phages were captured in our study. Of 166 samples tested, 33 yielded Oenococcus phage isolates that could be further propagated. Oenophages are therefore components of the enological ecosystem, and in most samples analyzed in our study, had no deleterious effects on MLF (in wines requesting this conversion). As reported for other environments, the sampling of phages appears to be limited by the procedures used to propagate them, and it may be argued that a first limitation is the use of a single indicator strain in our study, which may have biased the selection. Another point of great importance concerns sample preparation prior to analysis. Hence, the choice of the protocol (1, direct or 2, including growth in MRS) was shown to influence phage recovery. It is therefore advisable to use both protocols to isolate phages from the enological environment in future studies. Only 11 out of 33 samples tested positive for plaques with both protocols used. In contrast, the direct isolation protocol was shown to fail for 7 samples, and their incubation in MRS was necessary to visualize plaques. There may be several explanations for these results; first, the original samples were free of active phages, or had an initial phage count below levels of detection (10 PFU/mL). It is also reasonable to consider the possibility of an aggregation of phage particles in wine, leading to the retention of phage aggregates by the filter matrix during preparation of the sample in protocol 1. In all such instances, the fact that we observed plaques with protocol 2 suggests that release and/or enrichment during subsequent incubation in MRS has occurred, producing a lysate with a concentration exceeding the threshold. However it is difficult to establish how this was achieved. It is likely that the production of particles resulted from the lytic propagation of a small quantity of phages on indigenous strains. In MRS, the lysis time is 10 h for ΦOE33PA, while burst sizes of 25 and 45 have been measured for Φ1002 (Huang et al., 1996) and ΦOE33PA (Jaomanjaka et al., 2016), respectively. Alternately, the release and possible subsequent propagation of phages during the growth of indigenous lysogens, pseudolysogens, or cells having established a relationship with their hosts typical of the carrier state life cycle is also worth considering (Arendt et al., 1990). Spontaneous phage release occurs obviously in O. oeni and phage titers ranging from 10^3 to 10^5 PFU/mL have been reported in MRS cultures (Poblet-Icart et al., 1998; Tenreiro et al., 1993).

More intriguingly, although active phages were contained in 15 filtered samples, their presence could not be detected any more after inoculation and subsequent incubation of the sample in MRS broth (Table 2). Phages could have dropped below the detection limit because of the dilution rate in MRS (10^{-1}), or may correspond to low virulence bacteriophages that do not compete, or even grow in liquid culture. Alternately, oenophages could have lost activity during incubation in MRS, and two factors are here worth considering. First the impact on phage infectivity of a change in osmotic pressure due to the tenfold dilution of the sample in MRS may be questioned. Some data have shown that when phages are diluted from high salt concentration to low concentration solutions, phage DNA extrudes from the tail or their heads to break (Jonczyk et al., 2011). This phenomenon may be of particular relevance for must samples used to produce sweet wines. In this particular wine making process, grapes are infected by the mold Botrytis cinerea during extended ripening time prior to harvest, dehydrating the grape berries, which leads to elevated sugar concentrations in the must (300–500 g/L). Another possible factor leading to a loss of activity of oenophages may be the progressive acidification of the MRS

medium during incubation (Jaomanjaka et al., 2016). Such a modification can result from the growth and metabolic activity of endogenous microorganisms other than O. oeni, such as acetic bacteria, which are not inhibited by the presence of pimaricin in the MRS medium. All above mentioned possibilities would also imply that phage enrichment did not occur in MRS, and could therefore not counterbalance the dilution effect and/or phage decay.

Despite the obvious limitations inherent in our protocol, our first goal was reached and several oenophages were isolated from several wineries producing different types of wines. It should be reminded that oenophages were first isolated from white wines in Switzerland (Cazelles and Gnaegi, 1982; Sozzi et al., 1976). However, subsequent molecular characterization studies mostly focused on phages isolated from red wines (Davis et al., 1985; Henick-Kling et al., 1986; Jaomanjaka et al., 2013). Our newly-isolated phages associated with white wine-making are therefore interesting candidates for molecular characterization including sequence analysis and comparison in the future. As a first step toward exploring these issues, we decided to type the newly-isolated phages using our scheme based on integrase polymorphism. To this purpose, each purified phage lysate was submitted to four PCR assays (intA, intB, intC and intD). A total of 40 out of 71 lysates could be categorized into one of the four described int groups. The finding that these newly isolated oenophages harbor a single integrase type sequence in their genome is in agreement with (i) our previous characterization of oenophages isolated from wine samples (Jaomanjaka et al., 2013, 2016) and (ii) in-silico examination of whole genome sequences of lysogens performed at the Australian Wine Research Institute (Borneman et al., 2012) and in our laboratory (Jaomanjaka et al., 2013). A recent paper by Costantini et al. (2017) gives a different picture and suggests that some oenophages induced from lysogenic strains associated with Piemont wines might bear 2 or 3 types of integrase genes. The large collection of phages isolated from enological samples in our study now provides a powerful resource for performing whole genome sequencing. These data will add to the current repository of knowledge regarding oenophage genome architecture and evolution.

Among the 40 phages whose membership was determined, a majority were of the A and D-type, and this is in agreement with our first survey on red wines from Pauillac (Jaomanjaka et al., 2016). The rarity of C-type oenophages also confirmed our previous data. Compared to A, B and D phages, the purification of the single C-type phage was also more technically demanding. We presume that this phage may have a different fitness in the conditions prevailing during isolation. Since poly-lysogeny has been established in the O. oeni species (Borneman et al., 2012; Jaomanjaka et al., 2013), the C-type phage may also display a weak within-host competitive ability (Refardt, 2011).

The more important outcome of the study was the finding of a new group of 31 related phages, called unk. All members share similar RAPD and restriction profiles suggesting that they are strongly related at the genome level. Preliminary characterization of one of those unk phages called unk67.1, revealed that both phage morphotype and size of the genome are consistent with data reported for members of the four established groups, A to D (Arendt et al., 1991; Arendt and Hammes, 1992; Davis et al., 1985; Huang et al., 1996; Jaomanjaka et al., 2016; Santos et al., 1998). In contrast, unk phages did not exhibit several key genomic features, which are globally applicable to previously described oenophages (Borneman et al., 2012; Jaomanjaka et al., 2013, 2016). First their genomes did not contain the typical integrase sequences found in all temperate and ex-temperate oenophages. This unusual genomic feature suggests that they have a distinct and so far uncharacterized integrase, or that they are deprived of any integrase sequence, being true virulent phages. Accordingly, all our attempts to lysogenize O. oeni with unk67.1 failed. Unk phages also lacked a second conserved sequence located in the endolysin gene, previously associated with 90% of the oenophages previously described (Jaomanjaka et al., 2013, 2016). Another peculiar feature of unk phages was the absence of BamHI sites in their genomes. This contrasts with previous data showing that free active oenophages (Arendt et al., 1991; Boizet et al., 1992; Huang et al., 1996; Jaomanjaka et al., 2016) as well as resident prophages in publicly available sequenced bacterial genomes (belonging to A, B, C and D groups) (Borneman et al., 2012; Jaomanjaka et al., 2013) are all restricted by this enzyme. Nucleotide sequence information (preferably whole genome sequence) is now required to study diversity within the unk group. Differences might be expected since we observed that several unk phages associated with the same samples could be distinguished based on their distinct plaque morphotypes. Next-generation sequencing applied to unk phage will also give essential data to understand the evolutionary relationships with other groups, offering new tools to monitor and assess the ecological significance of bacteriophages in the oenological environment, including wine making equipments.

Our last objective was to provide a first insight in the distribution of oenophages along the vinification process, which is poorly understood. The isolation of phages from must (from red and white grapes) drew our attention as a previous trial by Nel and coworkers proved unsuccessful (Nel et al., 1987). This may be indicative of their presence on grapes, either as free particles, or following their release after spontaneous prophage induction of lysogenic strains. The incidence of O. oeni at the early stages of the vinification is known to be low, and the reservoir of O. oeni is currently questioned as the species has so far been seldom isolated from grape surfaces in the vineyard (Bae et al., 2006; Bokulich et al., 2012; Garijo et al., 2009; Nel et al., 1987). The use of non-culture based methods also supports the same conclusions and DNA of O. oeni has only been rarely detected from grapes (Bae et al., 2006; Renouf et al., 2005, 2007). Recent metagenomics data also failed to identify the species in the highly diverse microbiome associated with freshly crushed grapes collected from portuguese appellations (Pinto et al., 2015) and Dolce wines (botrytized wine) (Bokulich et al., 2012). Portillo et al. (2016) were recently successful in finding members of Oenococcus in grape musts from the Priorat region in Spain, which accounted for 5.5% (on average) of the total bacterial communities. Considering a burst size of 50 oenophages produced per infected bacterial cell, a value recently determined for ΦOE33PA (Jaomanjaka et al., 2016), phage monitoring is likely to lower the detection limits of O. oeni.

The question as to whether phages exclusively enter wine from vineyard has also to be raised. The low concentrations in phage measured in musts could also result from their presence in the winery (Bokulich et al., 2013). Free phages and/or lysogens are likely to shelter in equipments which often involve difficult to clean, porous surfaces. Accordingly, the ability of O. oeni to colonize different surfaces such as stainless steel tanks and oak barrels was recently demonstrated (Bastard et al., 2016).

Among the 15 wineries where sampling was done at two distinct steps (must/AF or AF/MLF), only five contained phages. In this small number of cases, we observed that oenophages were detected only in one step. With this caveat of small sampling size in mind, it is likely that contamination by free phages/lysogens present in equipments (pumps, pipes, tanks, barrels, filters) or in MLF starters may also explain why active oenophages were detected sporadically along wine making.

Irrespective of the source of oenophages (wineyards and/or winery equipements), their detection also depends on many factors including the ability of free phages to survive and persist in the temporally fluctuating enological environment, the kinetics of phage action, the proportion of lysogenic strains in the population and the kinetics of prophage excision during cell growth. Free oenophages are known to be progressively inactivated in wine. However, we still lack information about the physical and chemical factors inactivating phages at each step (acids, ethanol, sulfites or other so far unidentified components) and the kinetic patterns of inactivation. In the present study, the isolation of unk phages reinforces the view that oenophage diversity is higher than expected, and may suggest a degree of heterogeneity among phages

with respect to persistence.

On the other hand, presence of active phages should also probably account for the particular dynamics of the O. oeni population (see below), as well as for possible transitions between optimal virulent, and temperate (and possibly dormant) strategies along winemaking. In red wines, strains of O. oeni do not replicate during AF and populations usually remain at low titers (~ 10^3 CFU/mL). Owing to the fact that occurrences of lysogeny correlate well with conditions unfavorable for rapid host growth (Paul, 2008), the low concentration of indigenous O. oeni strains during AF may represent a reservoir for phages through stable lysogenization. Lysogeny may benefit the phage, as free particles would be otherwise rapidly inactivated in the surrounding medium. Lysogeny may also benefit the bacterial host. Prophages, by modulating substrate utilization capability and/or by providing new functions may help bacteria cope with harsh environments, especially during AF. Following AF, bacteria resume growth, and the population of O. oeni can reach ~ 10^8 CFU/mL after completion of MLF (Lonvaud-Funel, 1999). This increase in the population has been shown to result in the spontaneous release of phages by lysogens during growth (Ribéreau-Gayon et al., 2005), reaching a minimal threshold to enable detection in our studies.

In conclusion, we surveyed the occurrence of oenophages along wine making and isolated 71 phages. Proportions were assigned to a new group called unk with unusual genomic characteristics. Diversity is therefore higher than previously expected and further characterization of unk phages will now assess whether they are true lytic phages and provide additional signature genes for examining phage diversity in O. oeni. Our study also provides a great starting point for future studies on the persistence of phages in winery facilities in relation with hygienic practices.

Conflict of interest

Authors declare that no conflicts of interest exist.

Acknowledgments

Support for this project was provided by the French ANR (grants ANR-10-INBS-04-01 to the national infrastructure France BioImaging and ANR-14-20CE-0007 to the Enology group).

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.014.

References

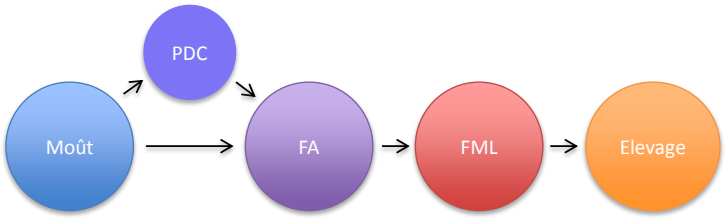
Arendt, E.K., Hammes, W.P., 1992. Isolation and characterization of Leuconostoc oenos phages from German wines. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 643–646.
Arendt, E.K., Neve, H., Hammes, W.P., 1990. Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of Leuconostoc oenos 58N. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 220–224.
Arendt, E.K., Lonvaud, A., Hammes, W.P., 1991. Lysogeny in Leuconostoc oenos. J. Gen. Microbiol. 137, 2135–2139.
Bae, S., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. J. Appl. Microbiol. 100, 712–727.
Ballestra, P., Jaomanjaka, F., Dols-Lafargue, M., Le Marrec, C., 2011. Oenophages: revisiting an old problem with new tools. In: Darriet, P., Geny, L. (Eds.), OENO 2011, Proceedings of the IX International Symposium in Enology in Bordeaux. Dunod, Paris, pp. 523–528.
Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243–259.
Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. Lett. Appl. Microbiol. 48, 149–156.
Bartowsky, E.J., Borneman, A.R., 2011. Genomic variations of Oenococcus oeni strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 441–447.
Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2016. Effect of biofilm formation by Oenococcus oeni on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. Front. Microbiol. 7, 613.
Bokulich, N.A., Joseph, C.M.L., Allen, G., Benson, A.K., Mills, D.A., 2012. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. PLoS One 7, e36357.
Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. PLoS One 8, e66437.
Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 139–148.
Borneman, A.R., McCarthy, J.M., Chambers, P.J., Bartowsky, E.J., 2012. Comparative analysis of the Oenococcus oeni pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. BMC Genomics 7, e29626.
Boizet, B., Mata, M., Mignot, O., Ritzenthaler, P., Sozzi, T., 1992. Taxonomic characterization of Leuconostoc mesenteroides and Leuconostoc oenos bacteriophage. FEMS Microbiol. Lett. 90, 211–216.
Capece, A., Siesto, G., Poeta, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2013. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional "Kakhetian" method. Food Microbiol. 36, 447–455.
Cazelles, O., Gnaegi, F., 1982. Enquête sur l'importance pratique du problème des bactériophages dans le vin. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 14, 267–270.
Clokie, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. Bacteriophage 1, 31–45.
Costantini, A., Doria, F., Saiz, J.C., Garcia-Moruno, E., 2017. Phage-host interactions analysis of newly characterized Oenococcus oeni bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. Int. J. Food Microbiol. 246, 12–19.
Davis, C., Silveira, N.F.A., Fleet, G.H., 1985. Occurrence and properties of bacteriophages of Leuconostoc oenos in australian wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 872–876.
Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A., 2003. Molecular characterization of Oenococcus oeni genes encoding proteins involved in arginine transport. J. Appl. Microbiol. 94, 738–746.
Doria, F., Napoli, C., Costantini, A., Berta, G., Saiz, J.C., Garcia-Moruno, E., 2013. Development of a new method for detection and identification of Oenococcus oeni bacteriophages based on endolysin gene sequence and randomly amplified polymorphic DNA. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4799–4805.
Fortier, L.C., Moineau, S., 2009. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. Methods Mol. Biol. 501, 203–219.
Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R., 2009. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. Int. J. Food Microbiol. 136, 142–146.
Henick-Kling, T., Lee, T.H., Nicholas, D.J.D., 1986. Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage. J. Appl. Bacteriol. 61, 287–293.
Huang, C.M., Asmundson, R.V., Kelly, W.J., 1996. Characterization of a temperate phage isolated from Leuconostoc oenos strain 1002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 472–476.
Jaomanjaka, F., Ballestra, P., Dols-lafargue, M., Le Marrec, C., 2013. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: Insights into a novel group based on the integrase sequence. Int. J. Food Microbiol. 166, 331–340.
Jaomanjaka, F., Claisse, O., Blanche-Barbat, M., Petrel, M., Ballestra, P., Le Marrec, C., 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium Oenococcus oeni. Food Microbiol. 54, 167–177.
Koskella, B., Brockhurst, M.A., 2014. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. FEMS Microbiol. Rev. 38, 916–931.
Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2017. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57, 856–873.
Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 317–331.
Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., Masneuf-Pomarède, I., 2012. Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. Int. J. Food Microbiol. 158, 93–100.
Mills, D.A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., Makarova, K., 2005. Genomic analysis of Oenococcus oeni PSU-1 and its relevance to winemaking. FEMS Microbiol. Rev. 29, 465–475.
Muniesa, M., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., 2005. Bacteriophages may bias outcome of bacterial enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4269–4275.
Nel, L., Wingfield, B.D., van der Meer, L.J., van Vuuren, H.J.J., 1987. Isolation and characterization of Leuconostoc oenos bacteriophages from wine and sugarcane. FEMS Microbiol. Lett. 44, 63–67.
Nisiotou, A.A., Rantsiou, K., Iliopoulos, V., Cocolin, L., Nychas, G.-J.E., 2011. Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. Int. J. Food Microbiol. 145, 432–436.
Paul, J.H., 2008. Prophages in marine bacteria: Dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? ISME J. 2, 579–589.
Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T., Hess, M., 2015. Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. Front. Microbiol. 6, 809.
Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. PLoS One 9, e85622.
Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2015. Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. Front. Microbiol. 6, 905.
Poblet-Icart, M., Bordons, A., Lonvaud-Funel, A., 1998. Lysogeny of Oenococcus oeni (syn. Leuconostoc oenos) and study of their induced bacteriophages. Curr. Microbiol. 36, 365–369.
Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., Bordons, A., 2016. Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). Int. J. Food Microbiol. 219, 56–63.
Refardt, D., 2011. Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. ISME J. 5, 1451–1460.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 316–327.
Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 149–164.
Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2005. Lactic acid bacteria development in wine. In: Handbook of Enology, the Microbiology of Wine and Vinifications, 2nd Edition. Volume 1. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 178–180.
Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning. CSHL Press.
Santos, R., São-José, C., Vieira, G., Paveia, H., Santos, M.A., 1998. Genome diversity in temperate bacteriophages of Oenococcus oeni. Arch. Virol. 143, 523–536.
Sozzi, T., Maret, R., Poulin, J.M., 1976. Mise en évidence de bactériophages dans le vin. Experientia 32, 568–569.
Sozzi, T., Gnaegi, F., D'Amico, N., Hose, H., 1982. Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de Leuconostoc oenos. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 14, 17–23.
Tenreiro, R., Santos, R., Brito, L., Paveia, H., Vieira, G., Santos, M.A., 1993. Bacteriophages induced by mitomycin C treatment of Leuconostoc oenos strains from Portuguese wines. Lett. Appl. Microbiol. 16, 207–209.
Zarraonaindia, I., Owens, S.M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N.A., Mills, D.A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., Gilbert, J.A., 2015. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. MBio 6 e02527-14.

Partie II. Apports complémentaires des analyses conduites sur les millésimes 2014 et 2015

Suite aux résultats obtenus sur le millésime 2014, une nouvelle collecte a été effectuée en 2015 en privilégiant cette fois des suivis cinétiques au sein de sept domaines réalisant des vinifications en rouge et/ou en blanc (**Tableau XX**). Etant plus familiarisée avec les protocoles et le traitement simultané d'un nombre élevé d'échantillons, j'ai pu gagner en rapidité de traitement des échantillons, et l'analyse a pu être réalisée le jour même de la collecte. Nous avons par ailleurs complété le dispositif en mesurant la dynamique de la population en bactéries lactiques en parallèle de celle des phages actifs. Ce chapitre rassemble les apports du millésime 2015 dans les réponses aux questions et hypothèses émises lors de l'analyse du millésime précédent.

Tableau XX. Echantillonnage du millésime 2015



Château	Suivi	Cépage					
Château I	1	Sauvignon Gris	x		x		x
	2	Sémillon	x		x		x
	3	Sauvignon	x		x		x
	4	Muscadelle	x		x		x
	5	Merlot	x		x	x	
	6	Cabernet Franc			x		5+6
	7	Cabernet Sauvignon	x		x		5+7
	8	Petit Verdot			x	x	
Château II	9	Merlot	x		x	x	x
	10	Cabernet Sauvignon			x	x	
	11	Sauvignon/Semillon	x		x		
	12	Semillon	x		x		
Château III	13	Merlot Bio			x	x	x
	14	Merlot Conv			x	x	x
Château IV	15	Sémillon		x	x		
	16	Sémillon			x		
Château V	17	Cabernet Franc	x		x	x	
Château VI	18	Merlot			x	x	x
	19	Cabernet Franc			x	x	
	20				x	x	
	21	Cabernet Sauvignon			x	x	
	22	Merlot				x	
Château VII	23	Merlot				x	

Les différentes étapes de la vinification sont représentées par des cercles de couleur au-dessus du tableau. Au total, 22 productions ont été suivies (suivi) dans 7 domaines différents (colonnes de gauche). Les différentes étapes de la vinification, au cours desquelles des échantillons ont été prélevés, sont représentées par des croix. Plusieurs prélèvements ont parfois été effectués en cours d'une même FA ou FML, et un délai de 3 jours minimum entre chaque prélèvement a été observé entre ces collectes. Au niveau de l'élevage, les assemblages réalisés entre productions sont indiqués.

1. Proportion d'échantillons positifs et étapes concernées

• Nous avons analysé la présence d'oenophages sur deux ensembles de 166 et 131 échantillons collectés sur les millésimes 2014 et 2015, respectivement.

• **Le pourcentage global d'échantillons positifs** varie de 20% (33/166) en 2014 à 38% (50/131) en 2015 (**Tableau XXI**). Cette variation peut être liée à une exécution plus rapide des analyses après collecte en 2015. Cependant comme indiqué dans le **Tableau XX**, l'échantillonnage se révèle très différent entre les deux millésimes et ceci peut expliquer également la différence observée.

Tableau XXI. Comparaison des échantillons analysés au cours des deux millésimes

	Millésime 2014		Millésime 2015	
	Nbre échantillons	Nbre positif (%)	Nbre échantillons	Nbre positif (%)
Moûts and PDC	31	12 (39%)	12	4 (33%)
FA	90	2 (2%)	65	21 (32%)
FML	24	15 (62,5%)	44	21 (48%)
Elevage	21	4 (19%)	10	4 (40%)
Total	166	33 (20%)	131	50 (38%)

• **La fréquence d'isolement varie selon l'étape à laquelle l'échantillon a été collecté.** Le millésime 2014 se caractérise par un nombre plus faible d'échantillons positifs en FA (2/90) par rapport aux autres étapes. Les distributions entre les étapes sont plus équilibrées sur le millésime 2015. Un tiers des échantillons de FA montrent la présence de phages en 2015. La FA représente l'étape où les paramètres physico-chimiques deviennent contraignants pour les oenophages, qui peuvent être fragilisés à cette étape. Ainsi, l'éthanol et le pH notamment sont susceptibles d'inactiver les phages comme démontré par Jaomanjaka *et al.* (2016) et Costantini *et al.* (2017). La rapidité du traitement a donc peut être favorisé la mise en évidence des oenophages à cette étape en 2015. Sur les deux millésimes, l'isolement de phages est plus fréquent à partir d'échantillons collectés durant la FML (62,5% en 2014 et 48% en 2015). Les niveaux de populations en phages sont également plus importants à cette étape, ainsi qu'en élevage (**Tableau XXII**).

Tableau XXII. Niveaux de populations en phages associés aux échantillons du millésime 2015

	Millésime 2015	
	Populations en phages (UFP/ml)	Protocole
Moûts and PDC	$0\text{-}10^2$	1
FA	$10^2\text{-}10^4$	1
	$10^2\text{-}10^4$	2
FML	$10\text{-}10^2$	1
	$10\text{-}10^5$	2
Elevage	$0\text{-}10^2$	1
	$0\text{-}10^5$	2

Ceci suggère que certains phages présents au départ du procédé ont persisté pendant la FA, ou bien qu'ils ont été induits lors de la croissance de souches lysogènes pendant l'étape de FML. Dans ce cas, l'introduction des phages dans le milieu étant plus tardive, ils conservent leur activité jusqu'au moment de l'analyse.

Pour les échantillons issus de vins en élevage, le pourcentage d'échantillons positifs est largement supérieur au cours du millésime 2015. L'échantillonnage en 2015 a ciblé l'étape de post-assemblage, alors qu'en 2014 les recherches ont été menées plus tard sur des vins en cours d'élevage.

2. Source des phages

• **Sur les deux dispositifs successifs d'expérimentation, les oenophages sont détectés dans les procédés de vinification en rouge comme en blanc**. Les échantillons positifs prélevés lors de vinifications en blanc sont de 10 sur 33 en 2014, et 11 sur 39 en 2015. La présence d'oenophages a été associée par le passé à des productions issues de grappes de Syrah (Shiraz), de Chasselas, et de divers cépages allemands. Nos études sur les deux millésimes permettent d'étendre le spectre à d'autres cépages blancs (Sauvignon-blanc, Sauvignon-gris, Sémillon, Muscatelle) et rouges (Merlot, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Gamay, Carménère, Petit Verdot). Les oenophages sont détectés au tout début du procédé à partir de moûts et de pieds de cuve, ce qui suggère que le raisin et/ou les matériels est (sont) une source de phages.

Ce point est illustré au travers du suivi réalisé dans un domaine de l'appellation Pomerol **(**Figure 25**)**. Sur cette propriété, des grappes de Merlot et de Cabernet Sauvignon ont été vendangées. Aucun phage n'a été identifié à partir des moûts issus de Merlot aux stades FA et FML, alors que des phages ont été associés à la production réalisée avec des grappes de Cabernet Sauvignon, où la FML s'est déclenchée de manière spontanée. Si l'on considère que l'hygiène des matériels (dont les cuves), a été similaire pour les deux types de vinification, alors les phages mis en évidence ont probablement été introduits *via* les baies, et ceci peut dépendre du cépage.

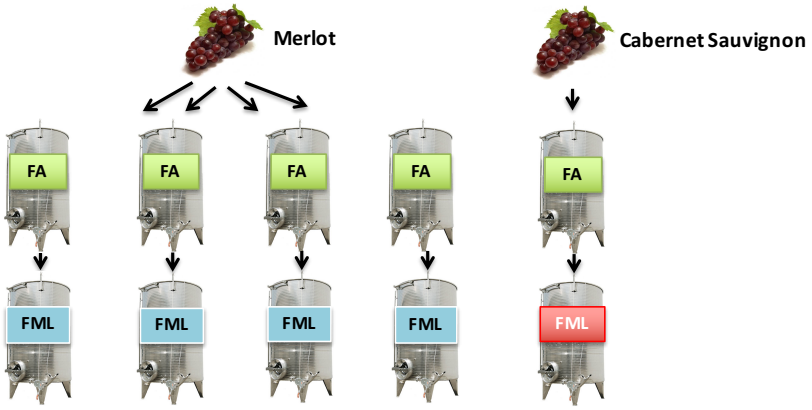


Figure 25. Exemple de FML spontanée (millésime 2014). Deux cépages ont été utilisés au sein de la même propriété (appellation Pomerol). Quatre cuves de Merlot ont suivi une FA puis une FML, où aucun phage n'a été détecté. Une cuve de Cabernet Sauvignon a été suivie en FA et FML. Le cadre rouge indique la détection de phages à ce stade. Le stade « moût » n'a pas été échantillonné.

• **Les levains sont également une source de phages**. Dans la propriété mentionnée ci-dessus, l'analyse du vin issu de Merlot nous a permis de proposer que les préparations de levains sont également susceptibles d'être une source de phages. Le vin après FA a été réparti dans 4 cuves où il a subi des conditions de FML différentes (**Figure 26**). Dans la première cuve, aucune inoculation n'a été réalisée et une FML indigène s'est déroulée. A contrario, les cuves n°2 et n°3 ont été inoculées par des mélanges commerciaux différents (Com1 et Com2). Enfin, la cuve n°4 a reçu un pied-de-cuve local. Seule la cuve n°3 a montré la présence de phages. Dans l'hypothèse où des procédés d'hygiène identiques ont été appliqués aux cuves, alors nous pouvons supposer que les oenophages ont été apportés *via* le levain inoculé.

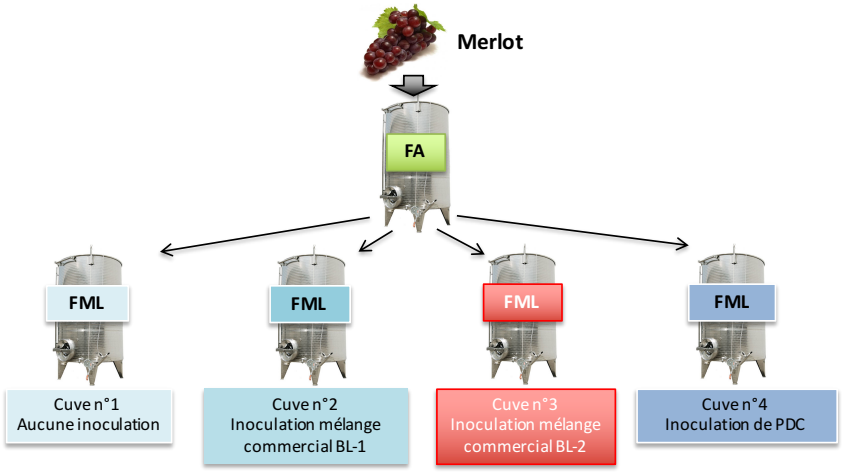


Figure 26. Exemple d'inoculation de levains FML (millésime 2014). Un moût de Merlot a été utilisé pour mener une FA. Le vin a ensuite été séparé dans 4 cuves, suivies en FML. Chaque cuve possède une modalité d'inoculation particulière : la première n'a pas été inoculée, réalisant alors une fermentation spontanée, les 2^{e} et 3^{e} ont été inoculées avec des levains commerciaux (mélange de bactéries lactiques), et la 4^{e} a été ensemencée avec un pied-de-cuve de la propriété. Le cadre rouge indique la présence de phages au cours de la FML dans la cuve n°3 ensemencée avec le mélange commercial n°2.

3. L'impact du protocole sur la détection de phages actifs

Le **Tableau XXIII** montre par quel(s) protocole(s) les échantillons positifs ont été mis en évidence sur les deux millésimes traités. Seuls 11 échantillons sur 33 ont montré la présence de phages par les deux protocoles en 2014, et la valeur est de 9 sur 50 en 2015 (**Tableau XXI**, ligne 1).

Tableau XXIII. Comparaison des efficacités des deux protocoles sur les deux millésimes 2014 et 2015

Etapes	2014 (33 échantilllons)			2015 (50 échantillons)		
	Prot. 1	Prot. 2	Prot. 1 and 2	Pro. 1	Prot. 2	Prot. 1 and 2
Total	15	7	11	18	23	9
Moûts and PDC	6	2	4	3	1	0
FML	4	5	6	8	9	4
FA	1	0	1	5	11	5
Elevage	4	0	0	2	2	0

La majorité des échantillons ont donc été obtenus préférentiellement avec l'un des deux protocoles, ce qui souligne leur forte complémentarité lors de la réalisation d'inventaires d'oenophages.

La non-détection par le protocole 2 peut être liée à la dilution de l'échantillon au 1/10 dans le MRS. Si la population phagique initiale est de l'ordre de 10-100 UFC/ml, et que ces phages ne disposent pas d'hôtes dans l'échantillon, alors la détection sera effective en protocole 1, et non en protocole 2. Il est également possible que la croissance rapide de bactéries (comme les bactéries acétiques) acidifie le milieu MRS et inactive les particules. Enfin, dans le cas de moûts très riches en sucres, un choc hypo-osmotique lors de l'introduction dans le MRS est susceptible d'inactiver les particules.

La non-détection par le protocole 1 peut indiquer un phénomène de co-agrégation des phages avec des particules du vin/moût qui est susceptible (i) d'entraîner leur élimination à la filtration, et (ii) se traduira par l'absence de détection par le protocole 1. Elle peut également témoigner d'une faible concentration en phages dans l'échantillon, sous le seuil de détection associé au protocole 1. Le dépassement du seuil après analyse par le protocole 2 peut s'expliquer de deux manières : (i) un phénomène d'induction des prophages accompagnant la croissance de souches lysogènes et /ou (ii) une propagation des phages lytiques endogènes grâce à la présence et à la croissance de souches hôtes sensibles dans le milieu.

On note que le protocole 1 est légèrement plus favorable lorsque les échantillons ont été collectés au début de la vinification. On peut supposer qu'à ce stade les échantillons contiennent des phages à

l'état libre en faible quantité, ou bien qu'il s'agisse de phages sensibles ou peu compétitifs. En ce qui concerne l'élevage, une supériorité du protocole 1 lors de l'analyse des échantillons en élevage a été observée en 2014, mais elle ne s'est pas reproduite en 2015. Cependant, le temps entre la mise en garde du vin et l'analyse est complètement différent entre les deux années : les bouteilles analysées en 2014 dataient de plusieurs années (2000, 2011 et 2012) alors que l'analyse a été réalisée sur les vins immédiatement en fin vinification en 2015. Enfin, pour l'étape de la FML, les deux protocoles donnent les mêmes résultats.

4. Le protocole 2 enrichit la population phagique

Nous avons retenu pour cette étude les échantillons issus de vinifications en rouge qui ont été détectés positifs pour la présence de phages avec les deux protocoles 1 et 2 sur le millésime 2015. Le facteur d'amplification de la population virale détectée a été calculé (UFC/ml protocole 2 par rapport aux UFC/ml protocole 1). Nous avons également ajouté les échantillons uniquement détectés en protocole 2 (la concentration en phages par le protocole 1 a été définie arbitrairement comme étant < 10 UFC/ml). Le rapport d'amplification est représenté en fonction de la population en bactéries lactiques (UFC/ml) dans l'échantillon original sur la Figure 27.

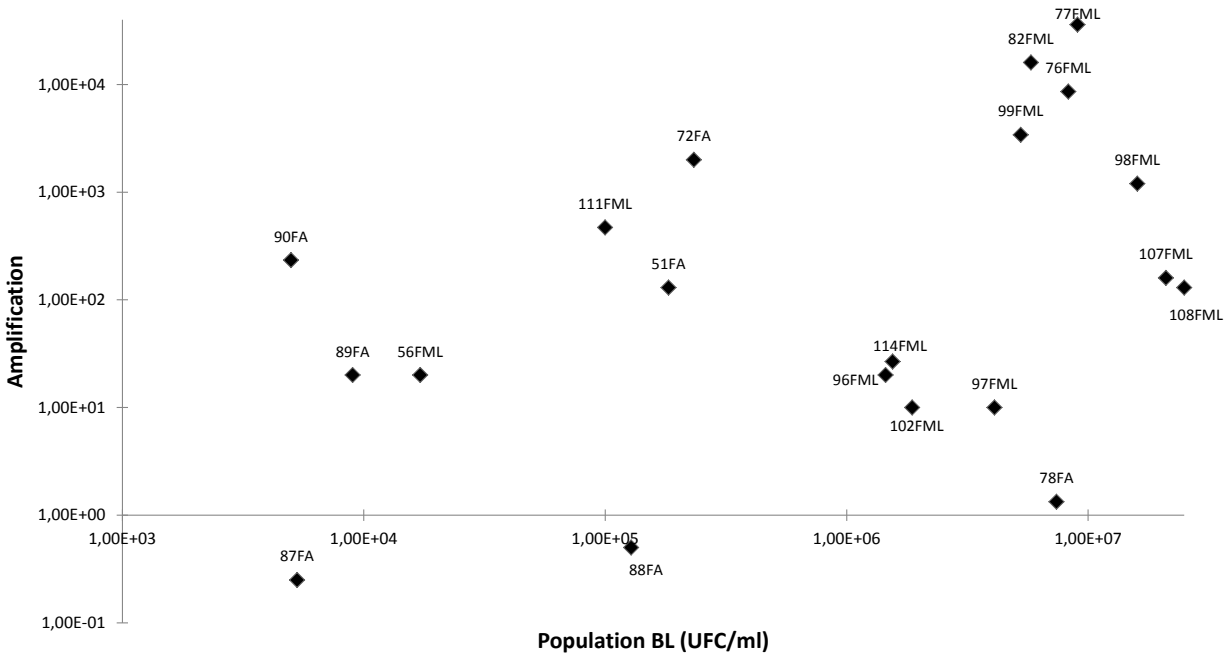


Figure 27. Amplification des phages par le protocole 2. L'amplification des phages grâce au protocole 2 correspond au rapport entre les populations mesurées en protocole 2 et en protocole 1. Le facteur est représenté en fonction de la population de BL retrouvée dans l'échantillon œnologique de départ.

Seuls deux échantillons de FA ont un facteur <1. Il s'agit de deux échantillons contenant 20-40 UFC/ml en recherche directe. Le protocole 2 détecte moins de phages lié au phénomène de dilution en MRS. Pour tous les autres échantillons, l'amplification est significative en fin de FA et en FML. Les plus forts taux d'amplification sont obtenus pour les populations de BL les plus élevées, et correspondent à des échantilons de fin de FML. L'échantillon 72 (Château II) est le troisième et dernier prélèvement réalisé en FA, et il est probable que la FML ait déjà démarré. Nos résultats montrent donc que les croissances des populations phagique et bactérienne sont liées. Il est difficile à ce stade de connaître la contribution dans le phénomène des deux sources possibles : développement lytique *vs* induction spontanée des prophages.

5. Les apports du typage dans l'analyse des 136 phages isolés

5.1. Modalités et résultats du typage

Les phages purifiés à partir des deux millésimes ont été typés selon le schéma Int. La distribution des phages de groupes A, B, C, D a été réalisée grâce aux amorces dessinées par Jaomanjaka (2014). Les résultats du typage des 136 oenophages isolés sont présentés dans le **Tableau XXIV**.

Tableau XXIV. Distribution des types de phages dans les échantillons selon le protocole utilisé

	2014		2015	
	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 1	Protocole 2
A	16	14	10	12
B	0	3	14	20
C	0	1*	0	2*
D	4	2	0	0
Non A,B,C,D	24	7	5	2
Total	44	27	29	36

*le phage C est associé à un second phage de type B

• De façon générale, les phages A sont quasi majoritaires dans nos deux inventaires (30/71 phages en 2014 et 22/65 en 2015).

Au contraire, les phages C et D sont les moins représentés. Le millésime 2015 confirme que les phages C ne sont jamais retrouvés seuls, et sont associés à un phage B. Ceci semble confirmer leur caractère défectif mentionné par Jaomanjaka *et al.* (2013), et leur nécessité d'exploiter un phage

« helper ». Le faible nombre de phages D isolés en 2014 (6) et leur absence en 2015 peut s'expliquer par une plus forte stabilité de la lysogénie chez les lysogènes correspondants. Jaomanjaka (2014) a ainsi montré que l'inoculation d'une souche lysogène pour un prophage de type D dans un vin rouge pouvait provoquer une induction des prophages D, mais la concentration n'excède pas 10^3 UFP/ml. Une autre hypothèse est qu'ils soient de mauvais compétiteurs en présence d'autres phages dans l'écosystème.

Comme en 2014, quelques phages isolés en 2015 (n=7) ne répondent pas aux PCR spécifiques des groupes A, B, C et D. Après purification, ils forment de larges plages claires, suggérant leur caractère lytique professionnel. La population « non ABCD » (et également nommée unk sur le millésime 2014) est toutefois moins représentée dans le nouvel inventaire (7/50) par rapport à 2014 (31/71). Leurs représentants seront étudiés en détail dans le Chapitre II. *A contrario*, les phages B sont plus largement représentés en 2015 par rapport à 2014. Toutes ces observations sont certainement en lien avec les différences d'échantillonnage appliquées lors des deux millésimes.

- Le **Tableau XXIV** donne également les distributions des types de phages selon le protocole utilisé. Le protocole 2 permet d'isoler sensiblement plus de phages de type B. Il peut être suggéré que les phages B sont plus sensibles en milieu vin, limitant leur détection en protocole 1. Leur source serait donc les souches lysogènes dans le milieu. Comme les phages de type B, les phages C sont isolés par le protocole 2, uniquement. Ceci va dans le sens d'une dépendance vis-à-vis d'un phage co-résident lors de l'induction. Enfin, nous remarquons que les phages « non ABCD » ont été principalement isolés grâce au protocole 1, et n'ont souvent pas été retrouvés en protocole 2 à partir des mêmes échantillons. Ces phages sont *a priori* lytiques. Ils ne peuvent donc pas apparaître par induction de souches lysogènes en croissance en MRS. Leur faible concentration en protocole 1 et leur moindre détection en protocole 2 peuvent suggérer qu'ils sont minoritaires au sein de la population virale.

5.2. Distribution des types de phages selon le type de vin et l'étape

La distribution des 136 phages isolés en fonction des types de vin et des étapes est montrée dans le **Tableau XXV**. On note que les phages de type A et B sont moins fréquemment associés aux premières étapes de la vinification et apparaissent lors des fermentations. On peut suggérer que les souches lysogènes pour les phages de type A et B sont en plus forte concentration lors de ces étapes,

et sont les réservoirs des phages. Les phages « non ABCD » sont présents dès le stade du moût, essentiellement à partir des cépages blancs. On les retrouve en vinification en rouge, au stade de la FML notamment, alors que ces phages sont *a priori* lytiques et ne sont donc pas libérés dans le milieu suite à l'induction de souches lysogènes. La recherche du réservoir de tels phages dans l'environnement est une piste pour de futurs travaux.

Tableau XXV. Distribution des différents types de phages selon le type de vin

Type de vin		***Millésime***	**A**	**B**	**C**	**D**	**Non typés**	**Total**
Blanc	Moût, PDC	2014	0	0	0	4	13	17
		2015	0	1	0	0	2	3
	FA	2014	0	0	0	0	0	0
		2015	5	5	0	0	0	10
	FML	2014	0	0	0	0	0	0
		2015	0	0	0	0	0	0
	Elevage	2014	0	0	0	0	0	0
		2015	1	0	0	0	0	1
Rouge	Moût, PDC	2014	5	0	0	0	0	5
		2015	0	0	0	0	2	2
	FA	2014	4	0	0	0	3	7
		2015	5	11	0	0	3	19
	FML	2014	18	3	1*	1	10	33
		2015	9	16	2*	0	0	27
	Elevage	2014	3	0	0	1	5	9
		2015	2	1	0	0	0	3

Nous avons ensuite évalué si les groupes de phages montraient une distribution particulière selon le type de vin analysé, blanc ou rouge (**Tableau XXV**). Seuls les phages C sont associés à des vins rouges. D'autre part, contrairement à notre observation faite en 2014, l'analyse du millésime 2015 ne confirme pas que les phages A sont spécifiques des vins rouges, et six entités sont également associées à des vins blancs en FA/élevage.

5.3. Richesse des échantillons en phages

Sur les 83 échantillons positifs, 14 ont montré la présence de plusieurs morphotypes de plages lors de l'étape d'isolement (**Tableau XXVI**). Nous avons ainsi pu observer jusqu'à 4 morphotypes distincts majoritaires sur la boîte retenue pour le dénombrement de la population phagique. Le typage moléculaire des phages isolés à partir des plages a globalement confirmé que la présence de plages d'aspects différents était corrélée à la présence de types génétiques différents. Ce critère semble

donc intéressant pour une première estimation de la diversité dans les échantillons. Les associations B+C et A+ « non ABCD » ont été retrouvées dans plusieurs échantillons. Deux échantillons (issus de Merlot et de Merlot-Cabernet Sauvignon) ont montré la présence simultanée de phages appartenant aux trois groupes A, D et non ABCD. La mise à disposition de marqueurs internes au sein des groupes ABCDunk permettra d'affiner cette étude. Ces aspects seront présentés dans le Chapitre II.

Tableau XXVI. Echantillons positifs contenant plusieurs types de phages

Millésime	Echantillon	Origine	A	B	C	D	Non ABCD
2014	148	Rouge, FML, Gamay, Gers	x	x			
2014	149	Rouge, FML, Merlot, Gers		x	x		
2014	151, 153, 155, 156, 160	Rouge, FML, CabS-Merlot, Médoc	x				x
2014	157	Rouge, FML, CabS-Merlot, Médoc	x			x	x
2014	131	Rouge, FA, CabS, Saint Emilion	x				x
2014	130	Rouge, FA, CabS-Merlot, Pauillac	x				x
2014	127	Rouge, élevage 2000, CabS-Merlot, Saint Emilion	x			x	x
2014	128	Rouge, élevage 2011, CabS-Merlot, Saint Emilion	x				x
2014	129	Rouge, élevage 2012, CabS-Merlot, Saint Emilion	x				x
2015	12	Blanc, FA, Sémillon, Entre-deux-Mers	x				x
2015	25	Blanc, FA, Muscadelle, Entre-deux-Mers	x	x			
2015	98	Rouge, FML, Merlot, Montagne-Saint-Emilion		x	x		
2015	47	Rouge, FA, Merlot, Montagne-Saint-Emilion	x				x
2015	107	Rouge, FML, Merlot, Montagne-Saint-Emilion		x	x		

6. La dynamique des flores lors de la vinification

Le millésime 2015 nous a permis de suivre conjointement la population en phages actifs et la population en BL. Sur les 7 domaines étudiés, aucun délai de FML n'a été signalé pour les vinifications en rouge. Les populations de BL ont évolué normalement, déclenchant la FML pour des concentrations en BL proches de 10^5-10^6 UFC/ml. Des phages ont été détectés aux différentes étapes en concentrations variables (10 à 10^5 UFP/ml). Aucune corrélation n'a été établie entre les paramètres physico-chimiques du vin et les niveaux de population (**Annexe I**). Les paramètres intégrés au test ont été le pH (concentrations d'acide malique et d'acide lactique), le degré alcoolique, la concentration en sucres (glucose + fructose) et l'indice de polyphénols totaux (IPT, qui correspondant à la quantité de molécules à noyaux benzéniques).

Parmi les suivis réalisés dans les différents domaines, l'exemple du domaine III est représenté sur la **Figure 28** (les autres suivis sont fournis en annexe). Cette propriété nous a permis de comparer les dynamiques de population en conditions biologiques et conventionnelles. Des titres de phages actifs plus importants ont été détectés en conditions biologiques. Ceci peut s'expliquer par une quantité de SO_2 ajoutée moindre dans les vinifications biologiques (le caractère anti-viral de la molécule a été démontré par le passé) (Henick-Kling *et al.*, 1986b).

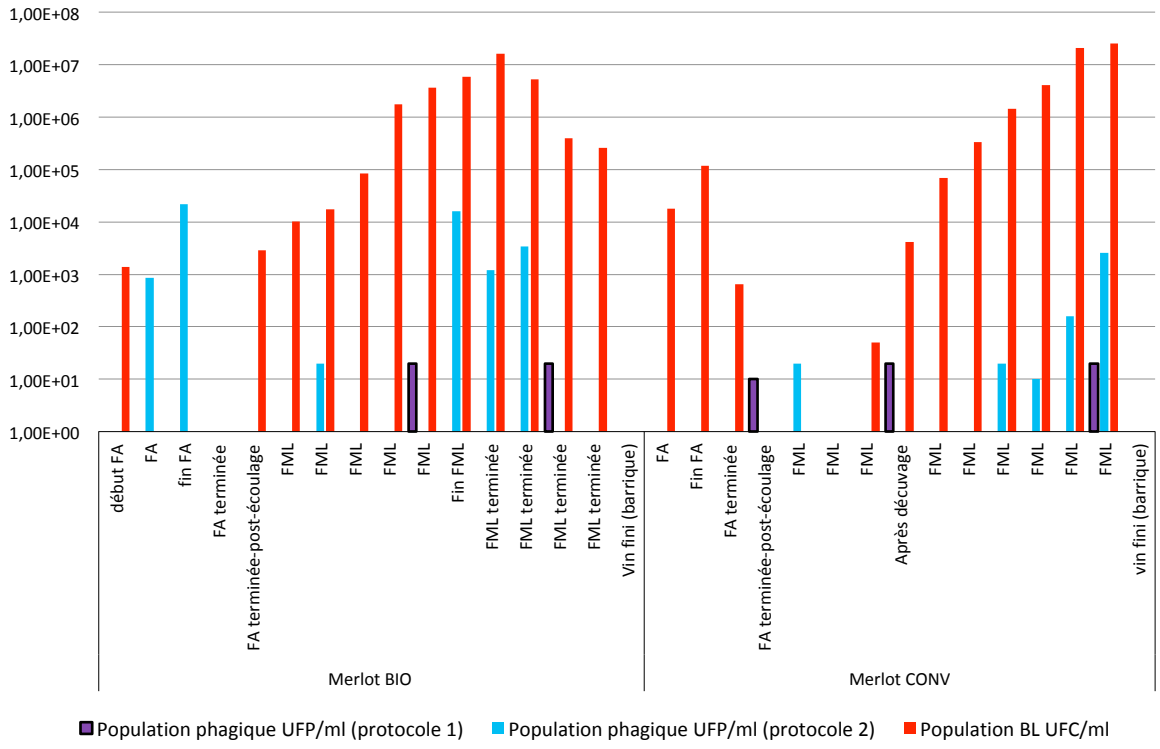


Figure 28. Dynamique des populations de BL et de phages actifs dans les vinifications en rouge menées dans le château III. Deux modalités de vinifications ont été utilisées : en respectant les normes d'agriculture biologique (BIO) et en vinification conventionnelle (CONV).

On observe également que les populations de phages sont détectées dès la FA dans l'approche BIO. Le suivi dynamique réalisé montre que deux types d'itinéraires présentent des écosystèmes différents, dont la signature peut être la population phagique.

Partie III. Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting *Gluconobacter cerinus*, an acetic acid bacterium associated with winemaking

Article submitted to Viruses (10/2017)

Cécile PHILIPPE[1], Mart KRUPOVIC[2], Fety JAOMANJAKA[1], Olivier CLAISSE[1,3], Melina PETREL[4] and Claire LE MARREC[1,] *

[1]Univ. Bordeaux, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), EA 4577, Unité de recherche OENOLOGIE, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

[2] Department of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France.

[3] INRA, ISVV, USC 1366 OENOLOGIE, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

[4] Univ. Bordeaux, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-US4 INSERM, Bordeaux, France

*** Correspondence** : clehenaff@enscbp.fr (Claire Le Marrec). Tel: +33-55-757-5831.

Running headline: Enological environment as a source of a novel tectivirus.

Key words : bacteriophage ; tectivirus ; wine making; must; acetic acid bacteria; *Gluconobacter cerinus.*

Abstract: The *Gluconobacter* phage GC1 is a novel member of the *Tectiviridae* family isolated from a juice sample collected during dry white wine making. The bacteriophage infects *Gluconobacter cerinus*, an acetic acid bacterium which represents a spoilage microorganism during wine making, mainly because it is able to produce ethyl alcohol and transform it into acetic acid. Transmission electron microscopy revealed tail-less icosahedral particles. The linear double-stranded DNA genome of GC1 (16,523 base pairs) contains terminal inverted repeats and carries 36 open reading frames, only five of which could be functionally annotated. These encode for the key proteins involved in DNA replication (protein-primed family B DNA polymerase) as well as in virion structure and assembly (major capsid protein, genome packaging ATPase and two minor structural proteins). Further investigation revealed that the bacteriophage has limited similarity to other tectiviruses and is a divergent member of the genus *Alphatectivirus*. GC1 is the first tectivirus infecting alphaproteobacterial host and is the first temperate alphatectivirus. Furthermore, GC1 helps to bridge the gap in the sequence space between alphatectiviruses and betatectiviruses.

Introduction

Acetic acid bacteria (AAB) are ubiquitous, strictly aerobic bacteria occurring in sugary, alcoholic and acidic niches. They are assigned to the order Rhodospirillales as part of the Alphaproteobacteria, within the family Acetobacteraceae. Their metabolic potential is expressed by the partial oxidation of carbohydrates, releasing the corresponding products (aldehydes, ketones and organic acids) into the surrounding media. Several species of AAB are therefore biocatalysts for the development of eco-friendly fermentation processes as an alternative to the chemical synthesis, and their oxidation machinery is exploited to produce a number of compounds such as L-ascorbic acid, dihydroxyacetone, gluconic acid and cellulose (see Raspor and Goranovic, 2008). More recently the role of AAB in the production of exopolysaccharides of high molecular weight has been emphasized offering a promising alternative in the medical and food industries (Jakob *et al.*, 2013; Ua-Arak *et al.*, 2017). Members of the group have been also reported in a range of food and beverage ecosystems, and play a positive role during the fermentation of vinegar (Mas *et al.*, 2014), cocoa bean (De Vuyst and Weckx, 2016), kefir, kombucha, and acidic beers (Pothakos *et al.*, 2016). In contrast, AAB represent spoilage microorganisms during wine making, mainly because they are able to produce ethyl alcohol and transform it into acetic acid. Product spoilage is legally defined by volatile acidity, largely composed of acetic acid (Bartowsky and Henschke, 2008). AAB can also produce other depreciating compounds such as ethyl acetate, acetoin from lactic acid, dihydroxyacetone and

increase ropiness. Detection of AAB is reported at all stages, from the mature grape through vinification to conservation (Joyeux *et al.*, 1984; Bartowsky and Henschke, 2008; Navarro *et al.*, 2013). AAB originate from the leaves of the grapevine and the grapes themselves and fruit flies are considered as a common vector in propagating AAB. Different authors have observed that the less healthy the grapes, the higher the amount of AAB (Barata *et al.*, 2012, Mateo *et al.*, 2014). In particular, sweet wines produced from botrytized (noble rot) exhibit significantly greater abundance of AAB compared to unaffected wines, and development is in positive correlation with the Botryotinia sp. on grapevine leaves and in botrytized wine fermentations (Bokulich *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2015). Controlled dispersion can also be guided by practices and lack of hygiene may also result in AAB being carried into the finished product. The control of AAB is challenging as these bacteria show great capacities to persist during wine making. Hence, Portillo and Mas (2016) demonstrated that strains of *Gluconobacter spp* can persist at high abundance throughout wine fermentation in non-botrytized Grenache fermenting musts, and a decrease in the population was only achieved at the end of alcoholic fermentation.

The relationships between AAB and their phages has so far received limited attention although could reveal interesting insights in the persistence capacities of these bacteria during fermentation. A few *Gluconobacter* and *Acetobacter* phages have been isolated from decaying apples (Kiesel and Wünsche, 1993) and also from plants where they had been causing disturbances during sorbose fermentation (Schocher *et al.*, 1979) or submerged spirit vinegar fermentations (Stamm *et al.*, 1989). As demonstrated in other ecosystems, prophages can provide multiple benefits to the host for surviving adverse environmental conditions (Howard-Varona *et al.*, 2017). Alternately lytic phages and/or their endolysins could represent an interesting and eco-friendly way to limit AAB on grapes, and/or later during wine making. Several traditional ways of controlling the growth of spoiling bacteria including AAB are used during wine making (see for review Bartowsky and Henschke, 2008; Valera *et al.*, 2017). They include the use of antimicrobial compounds to stabilize wines. Lysozyme from chicken egg white, an antibacterial compound commonly used to stabilize wines, is not effective against AAB. In contrast, these bacteria can be controlled by the effective addition of SO_2. However, some members of the AAB family can be responsible for the increases in SO_2 binding power of musts, especially from botrytized grapes (Barbe *et al.*, 2001). The reduction or elimination of synthetic chemical products is now a major preoccupation in viticulture and during wine making. The concept of utilizing phages to control AAB contamination in wine making is all the more attractive as it recently proved to be effective in other drastic environment such as yeast fermentation processes (Bertozzi-Silva and Sauvageau, 2014; Worley-Morse *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015) and has been the

subject of patent applications. Applications may be also developed in the vineyards and follow the example of Das *et al.* (2015) who used phages to control the Pierce's Disease of grapevines, caused by *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*.

This study reports a survey of phages of AAB collected from grapes which resulted in the isolation and sequencing of a novel phage infecting *G. cerinus*, representing a novel member of the family *Tectiviridae*. Tectiviruses have tailless virions consisting of an icosahedrally organized proteinaceous capsid that surrounds a protein-rich lipid membrane, enclosing a linear double-stranded (ds) DNA genome with inverted terminal repeats and covalently attached terminal proteins (Bamford *et al.*, 1995; Butcher *et al.*, 2012; Abrescia *et al.*, 2004, Redrejo-Rodríguez and Salas, 2014; Berjón-Otero *et al.*, 2015). Currently known tectiviruses are classified into two genera, *Alphatectivirus* and *Betatectivirus* (Gillis *et al.*, 2017). The former genus includes 6 closely related viruses (93-98% nucleotide identity), exemplified by the bacteriophage PRD1 and infecting gram-negative bacteria of the class *Gammaproteobacteria* (Saren *et al.*, 2005). By contrast, members of the genus *Betatectivirus* include 6 closely related phages (67-99% nucleotide identity), represented by bacteriophage Bam35 and infecting gram-positive firmicutes of the genus *Bacillus* (Gillis and Mahillon, 2014a; Jalavuori *et al.*, 2013). Despite close genetic relationship within each genus, members of one genus generally display no detectable sequence similarity to viruses from the other genus (Ravantti *et al.*, 2003; Berjon-Oteron *et al.*, 2017), suggesting an ancient divergence of the two tectivirus lineages. Furthermore, whereas all known alphatectiviruses are strictly lytic (Krupovic *et al.*, 2008), betatectiviruses are temperate, persisting within their hosts as linear plasmids (Gaidelyte *et al.*, 2005, 2006; Fornelos *et al.*, 2015). Nevertheless, structural studies have shown that virion architecture is conserved across the family (Laurinmäki *et al.*, 2005; Abrescia *et al.*, 2004) and is shared with many other dsDNA viruses infecting hosts in all three domains of life (Krupovic and Bamford, 2008). Based on comparative genomics and structural analyses it has been recently proposed that bacterial tectiviruses have played a key role in the evolution of many groups of big and giant dsDNA viruses of eukaryotes (Krupovic and Koonin, 2015; Koonin and Krupovic, 2017). Here we describe the first alphatectivirus, GC1, infecting alphaproteobacterial host. Unlike other alphatectiviruses, GC1 is a temperate virus and displays the highest nucleotide divergence from other known members of the genus, providing an evolutionary link between the two tectivirus genera.

Material and methods

Strains and media

Strains of acetic acid bacteria (AAB) were obtained from three culture collections: ATCC, CIP and CRBO (Centre de Ressources Biologiques Œnologie, ISVV, France) and included different strains of *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter cerinus* and *Gluconobacter oxydans* (**Table 1**). Yeast-Peptone-Mannitol (YPM) broth was used for growth of AAB. This medium contains 5 g/l yeast extract, 3 g/l peptone, 25 g/l mannitol and its pH is adjusted to pH 5. Liquid cultures were aerated for 24 h at 30°C in a rotary shaker at 250 rpm.

Table 1. Strains used in the study

Strains	Name	Isolation	
		year	source
Acetobacter aceti	CRBO08ba14	2008	Grapes, Aquitaine
	CIP103111*	na	Alcohol vinegar
	ATCC15973*	na	Wine vinegar
Acetobacter pasteurianus	CRBO03ba01, CRBO03ba02	2003	na
	CRBO08ba01, CRBO08ba03	2008	Grapes, Aquitaine
Gluconobacter cerinus	CRBO11174, CRBO11176, CRBO11178, CRBO11179	2011	Matured grapes, Grande Ferrade, INRA Bordeaux
	CRBO96ba02	1996	Grapes, Pessac-Leognan
	CRBO96ba39	1997	Matured grapes, Bordeaux (La Tour Blanche)
Gluconobacter oxydans	CRBO11187	2011	Matured grapes, Bordeaux
	CRBO11203, CRBO11204, CRBO11205	2011	Matured grapes, Léoville

*Type strain

Isolation of acetic acid bacteria from grapes

Grapes containing noble or grey rot were collected in a sterile seal plastic bag from a wine estate located in the Sauternes area near Bordeaux (France) in November 2014. These samples were transported to the ISVV and processed immediately. Grapes were hand crushed aseptically, and the two obtained grape juices (named noble and grey) were immediately serially diluted in 0.85% saline. Both samples were plated on red grape juice (RGJ) agar. The medium contains per liter: 250 ml of red grape juice, 5 g of yeast extract, 1 ml of tween 80, 20 g of agar and its pH is adjusted to 4.8. It was

supplemented with 0.1 ml of a 0.25% solution of penicillin (to inhibit the growth of LAB) and 0.2 ml of a 0.25% alcoholic solution of pimaricin (to suppress the growth of yeasts and molds. After 3-5 days of incubation at 30°C, 18 colonies from each sample were randomly picked and streaked on Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate (GYC) agar. This medium contains 10 g/L yeast extract, 50 g/L glucose, 50 g/L $CaCO_3$ and 20 g/L agar. Colonies that produced a clear halo were subjected to a catalase test. The catalase positive colonies were considered as putative AAB isolated and analyzed by molecular methods.

AAB identification

DNA was extracted from the bacterial isolates and stored using the FTA®CloneSaver™ card (Whatman® BioScience USA). DNA was used as template to be amplified by PCR with 16SDNA primers 8F and 1063R (Wang and Qian, 2009). A Biorad i-Cycler was used for the amplification reactions, which were achieved in a 25 µl volume using the Taq 5x Master Mix kit (New England, Biolabs, Evry, France) and 0.2 µM of each primer. PCR conditions were 95°C for 5 min, 30 cycles at 94°C and 58 °C for 1 min each, 72°C for 1.5 min, and 72°C for 7 min. Both strands of the amplified DNA of clones were sent to GATC Biotech (Konstanz, Germany) for Sanger sequencing. The gene sequences were aligned and compared with other 16S rDNA genes in the GeneBank, using the NCBI Basic Local Alignement Search Tools BLASTn program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Identification was considered valid when the identity of a contiguous sequence of 343 bp-989 bp was at least 98%.

Isolation and purification of phages infecting AAB

A total of 30 wine and must samples (**Table 2**) were centrifuged (5000 *g*, 10 min) and filtered using 0.2 µm membrane filters made of polyether sulfone. All samples were stored at 4°C. Presence of phages was assessed using the classical double-layer plating technique described by Philippe *et al.* (2017), on YPM_F agar (YPM supplemented with $MgSO_4$ 3.75 g/l and $CaCl_2$ 2.375 g/l). A mixture of a mid-log culture of each of the 17 indicator strains (0.2 ml at OD_{600nm} 0.2-0.3) (see **Table 1**) and 100 µl of samples (or dilutions thereof) were added in 5 ml of molten soft-agar and poured on a bottom YPM_F plate. Plates were incubated at 30°C for 24 hours before examination of plaques. Isolated plaques were picked, suspended in 0.5 ml of sterile YPM_Φ medium and stored at 4°C. They were propagated on the same strain and plaques picked again. This step was repeated twice to ensure purity.

Production of high-titers lysates

Phage lysates were prepared by culturing *G. cerinus* CRBO11179 to an OD_{600} of 0.2 and addition of phage particles at a multiplicity of infection (MOI) of 0.003. Infected cultures were incubated at 30 min for adsorption and shaken until lysis was observed. The sample was centrifuged, and the supernatant was filtered. Phage titers ranging from 10^8 to 10^{10} PFU/ml were obtained and stored at 4°C until use.

Table 2. Global survey of phages infecting AAB in 30 samples of oenological origin

Samples[a]	**Wine**	**Appellation/grape variety**	**Step**	**Estate**[b]
67, 68, 69, 70	Sweet white	Sauternes/Sémillon	Must	I
14			PDC	O
12	Dry white	Bordeaux/Sémillon	PDC	N
1		Bordeaux/SauvBlanc	Must	A
2			Juice for PDC	K
26			PDC	
27, 29			Early AF	
31		Lussac Saint Emilion/SauvBlanc	PDC	E
125	Red	Saint-Emilion/CabFranc		na
18		Saint Emilion/Merlot	Must	M
62				G
3		Lussac Saint Emilion/Merlot	Must	M
30				E
22, 23, 24			PDC	D
60, 63		Margaux/Merlot	Must	na
61		Entre-Deux-Mers/Merlot	Must	B
143		Pomerol/CabSauv	MLF	H
144, 147		Pomerol/ Merlot		
148		Gers-Gamay/Merlot		na
149		Gers/Merlot		
151, 153		Medoc/CabSauv		

[a] Estates are named with a letter according to Philippe et al. (2017); na, non-available; [b] 30 samples were collected at different steps and positive samples are underlined.; PDC, pied de cuve; AF, alcoholic fermentation ; MLF, malolactic fermentation.

Chloroform sensitivity assay

GC1 phage samples (2 ml) were incubated with and without various volumes of chloroform (up to 80 µl) in capped glass tubes with gentle mixing at room temperature for 15, 30 and 60 min. The titers of the mixtures were then determined on *G. cerinus* CRBO11179.

Concentration of phage

To obtain highly concentrated phage preparations, 500 ml of phage lysate was treated with DNase I (1 μg/ml; Invitrogen, Illkirch, France) and RNase A (1 μg/ml; Promega, Charbonnières, France) at 37°C for 30 min. Polyethylene glycol (PEG) precipitation was carried out as follows. Sodium chloride (final concentration, 1 M) and PEG 6000 (10%, w/v) were added to the treated lysate. The sample was stored overnight at 4°C and sedimented 10 min at 11 000 *g* at 4°C. The pellet was carefully washed twice in TM buffer (50 mM Tris-HCl, $MgS0_4$ 10 mM), and resuspended in a small volume of the same buffer resulting in a 25 fold concentration.

Electron microscopy

Phages (10 μl; ~ 10^{10} /ml) were deposited on carbon-coated copper grids (200 mesh) for 30 s, and colored with uranyl acetate (saturated in water, pH 4.5 for 30 s). Stained particles were examined with a Hitachi H7650 electron microscope operated at 80 kV.

Dynamic light scattering (DLS)

The particle size of GC1 was measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Z/S system (Malvern, United Kingdom) at 37°C. Cuvettes filled with the sample were carefully inspected to avoid air bubbles. Phages were diluted in distilled water (dH_2O) to a final concentration of 10^8 PFU/ml. Measurements were repeated at least three times.

Extraction of phage DNA and restriction digestion

A purified lysate (25 ml, titer ≥ 10^8 PFU/ml) was added with PEG (10%) as previously described. After one night at 4°C, the sample was centrifuged (9000 rpm for 30 minutes at 4°C). The pellet was suspended in 500 μl of TM buffer and treated with DNAse and RNAse (1 μg/ml) at 37°C for 30 min. Phage DNA was first purified using the standard method used in our laboratory to extract oenophage DNA (phenol chloroform method) (Jaomanjaka *et al.*, 2016; Philippe *et al.*, 2017) and originally described by (Sambrook and Russell, 2001). However the method failed in extracting the GC1 DNA. The nucleic acid could only be extracted following denaturation of the viral coat proteins using proteinase K and treatment with a higher concentration of SDS as described by Zinno *et al.* (2010) to purify DNA from *Streptococus thermophilus* bacteriophages.

Purified phage DNA was resuspended in 50 μl of Tris–EDTA buffer (pH 7.6), and quantified by optical density at 260⁄280 nm with a Biospec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Columbia, USA). DNA was

digested with the restriction endonucleases *Eco*RI, *Eco*RV and *Nde*I under the conditions recommended by the manufacturer (New England Biolabs, Evry, France). Restricted DNA was electrophoresed on 0.8% (w/v) agarose gels in 1 × TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), and visualized by UV photography after staining with ethidium bromide. The 100-bp DNA ladder (PM) (New England Biolabs, Evry, France) was used as marker. The size of the phage genome was estimated by summing up of the lengths of restriction fragments.

DNA sequencing

Phage GC1 was sequenced at the CGFB platform (Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux) using the Truseq kit (Illumina) and an Illumina Miseq system with 2 × 250 bp paired-end reads. Assembly of the resulting reads was performed using SPAdes version 3.10.1 (Bankevich *et al.,* 2012). The inverted terminal repeats were amplified by PCR (**Table 3**) and sequence determination obtained by Sanger sequencing (Eurofins). Structural and functional annotations were obtained from Prokka (Seeman, 2014). Genome alignments were performed using EasyFig (Sullivan *et al.*, 2011); complete sequences of the *Salmonella* bacteriophage PRD1 and *Bacillus* phage Bam35c (GenBank accession numbers: NC_001421 and PRJNA14311, respectively) were used for comparison. The nucleotide sequence determined in this study was submitted to the GenBank database under accession numbers MG159787.

Table 3. Primers used in the study

Name	Sequence (5'- 3')	Position on GC1- genome
ITR-F	CTCTTCCACGGCAACAATCC	271 – 252 16253 – 16272
ITR-R	ACAAGTACTACAGGGAGGGG	52 – 71 16472 – 16453
gp1-F	TAAGCGCGGATGGTTTAAGC	567 – 548
Gp36-F	TACAATCGTGACGGCGGATA	15638 – 15657

Primers ITR-R and gp1-F amplified a 516 bp amplicon (left ITR).Primers ITR-R and gp36 F amplified a 835 bp amplicon (right ITR) (see Fig. 5).

Homology searches and phylogenetic analyses

The *in silico*-translated protein sequences were used as queries to search for sequence homologs in the nonredundant protein database at the National Center for Biotechnology Information using BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) with an upper threshold E value of $1e^{-3}$. Searches for

distant homologs were performed using HHpred (Söding *et al.*, 2005) against different protein databases, including PFAM (Database of Protein Families), PDB (Protein Data Bank), CDD (Conserved Domains Database), and COG (Clusters of Orthologous Groups), which are accessible via the HHpred website. Searches against the CDD database at NCBI were also performed using CD-search (Marchler-Bauer and Bryant, 2004).

For phylogenetic analyses, sequences were aligned using PROMALS3D (Pin and Grishin, 2014) and uninformative positions removed using the *gappyout* function of trimAL program (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009). Phylogenetic trees were constructed using the PhyML (Guindon *et al.*, 2010), the latest version of which includes automatic selection of the best-fit substitution model for a given alignment. The best models were identified by PhyML as follows: LG+G (ATPase); RtREV +G+F (MCP); VT +G+I+F (DNAP). A Bayesian-like transformation of aLRT (aBayes), as implemented in PhyML (Guindon *et al.*, 2010) was used to estimate branch support. Pairwise intergenomic distances between all sequenced tectiviruses were calculated with the Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) method using VICTOR tool (Meier-Kolthoff and Göker, 2017).

Results and Discussion

Isolation of GB1 from enological samples

We explored the *presence of phages* infecting AAB in 30 enological *samples.* As shown in **Table 2**, the samples corresponded to musts, PDC, and wines collected during the 2013 and 2014 vintages from various wineries, making red, dry white and sweet Bordeaux (Sauternes) wines (Philippe *et al.*, 2017). Each of the 30 samples was tested against a panel of 17 isolates belonging to the two main genera of AAB associated with wine making, namely *Gluconobacter* and *Acetobacter* (**Table 1**). During the survey, a juice sample collected during dry white wine making, produced a few plaques on strain *Gluconobacter cerinus* CRBO11179. A single plaque was subsequently isolated, and a pure stock of phage GC1 was prepared following three successive rounds of plaque purification. A high titer phage stock was prepared by liquid infection in YPM broth. Optimal infection was observed at an MOI value of 0.003, and the phage titers as high as 10^{10} PFU/ml in the lysate were obtained after 6 hours of incubation at 30°C. As seen in **Fig. 1**, phage GC1 produced turbid plaques on its host. Lysogenic cell lines were obtained from the centers of plaques and proved to be resistant to GC1 infection. All together, these results suggest that GC1 is a temperate virus.

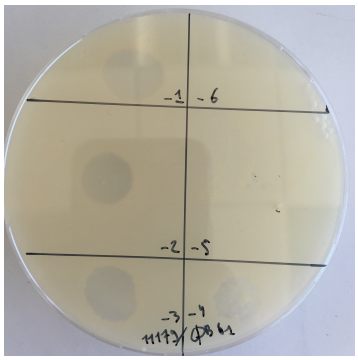


Figure 1. Plaques produced by phage GC1 on *G. cerinus* ATCC 11179.

Host spectrum

The GC1 high titer lysate was used to perform a host range test. We first confirmed that GC1 could not infect any of the 16 strains used during the initial survey, including 3 isolates of *G. cerinus* and 4 isolates of each of the following species: *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti* and *Acetobacter pasteurianus.*

Mateo *et al.* (2014) recently observed that *G. cerinus* was dominantly recovered from grapes, especially in mold-infected and rot-affected grapes. To find additional hosts for GC1, grapes containing grey (G) and noble (N) rot were collected in Sauternes (France) and screened for AAB. A total of 36 colonies grown on GY were randomly selected and their sensitivity towards GC1 assessed. The phage was able to infect two isolates recovered from noble rot (N8 and N11), and the infection was as productive as the one observed with strain CRBO11179 (efficiency of plating [eop] of 1). Sequencing of 16S rDNA showed that both isolates also belonged to the *G. cerinus* species (100% id). Thus, our results show that the host spectrum of GC1 is likely to be limited to strains belonging to the *G. cerinus* species. However it is noteworthy that although the phage has been isolated from a juice sample collected during dry white wine making, it is active against strains associated with other wine types: a red wine for strain 11179, and sweet wine for N8 and N11.

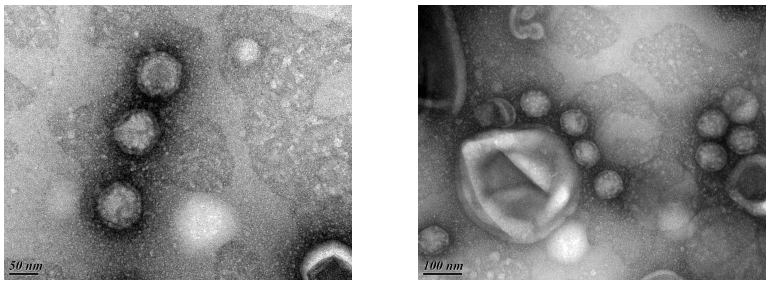
Morphology and genome analysis

Transmission electron microscopy revealed tail-less icosahedral particles, which displayed a diameter of c. 78 nm in width (**Fig. 2A**). Accordingly, the diameter measured using dynamic light scattering was 85 nm (**Fig. 2B**). The absence of a visible tail structure suggested that GC1 is not a member of the order *Caudovirales*, the most common type of bacterial viruses (Ackermann and Prangishvili, 2012), but instead could belong to either one of the three families of tail-less

bacteriophages with isometric capsids, namely *Tectiviridae* (Bamford *et al.*, 1995), *Corticoviridae* (Oksanen *et al.*, 2017) or *Sphaerolipoviridae* (Pawlowski *et al.*, 2014).

To gain a more ample understanding of the phage, nucleic acid was extracted from the GC1 viral particles. The extracted nucleic acid could be digested with different type II restriction endonucleases, including *Eco*RI, *Nde*I and *Eco*RV, showing that GC1 has a double-stranded *DNA* (dsDNA) genome (**Fig. 3**). The average size of the genome estimated from the sum of DNA fragments generated with the three restriction endonucleases was 17 kb, and the genome did not contain a *cos* site (data not shown).

(a)



(b)

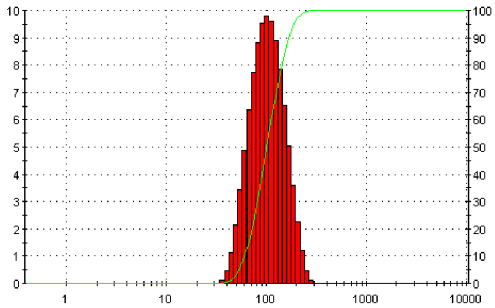


Figure 2 Morphology and size of BG1 particles. (a) Transmission electron micrographs of phage BC1. Scale bars are 50 nm (left) and 100 nm (right), (b) Average size (nm) of the particles in DLS analysis, using a Zetasizer Z/S system (Malvern, United Kingdom).

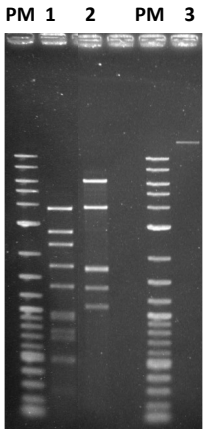


Figure 3. Restriction enzyme patterns of phage GC1 DNA. Lane 1, EcoRI; lane 2, EcoRV, lane 3, undigested DNA. PM, 2-Log DNA ladder (Biolabs).

Based on the data obtained through sequencing, the genome of GC1 could be assembled into one final contig that comprises 16,523 bp, which is in reasonable agreement with our first estimated value. The virtual digest of the assembled contig with *Eco*RI and *Eco*RV matched the restriction profiles of the phage DNA digested with the same enzymes, confirming the proper assembly. These results indicate that phage GC1 has a small dsDNA linear genome with inverted terminal repeats (ITR) of 326 bp at both termini. Two pairs of primers specific to each extremity of the linear genome were designed (see **Table 3**) and used to confirm that the ITRs are indeed adjacent to ORF1 and ORF36, respectively. The same sets of primers were also used to screen lysogens isolated from the turbid plaques. Collectively, the morphological and genomic characteristics of GC1 suggest that it belongs to the family *Tectiviridae*. Notably, the genome of GC1 is the largest among known tectiviruses, none of which exceeds 15 kb.

Virion stability

Tectiviruses have a lipid bilayer beneath the icosahedral protein shell which is formed of approximately equal amounts of virus-encoded proteins and lipids derived from the host cell plasma membrane (Laurinavicius *et al.*, 2004). Upon infection, the viral membrane transforms into a tail-like structure, which plays a crucial role in the delivery of the viral genome into the host cell by forming a tubular structure that penetrates the cell envelope (Grahn *et al.*, 2002; Peralta *et al.*, 2013). To test if GC1 virions contain lipids, the original lysate was treated with different concentrations of chloroform. Figure 4 shows that the solvent reduced virus infectivity in a concentration and time dependent manner. The phage was not completely inactivated, and increasing the $CHCl_3$ concentration to 30% produced the stronger reduction (3 log) within 30 min. Our results are therefore consistent with GC1 possessing an inner lipid membrane. The sensitivity of other reported

tectiviruses such as Wip1, Bam35 and GIL16 to chloroform has been tested in the past. However different protocols have been used to prepare the lysates making comparisons difficult. We also observed that incubation of the GC1 lysate at 4°C for three months decreased the virus titer by 1 log. Taken together the results suggest that GC1 virions are physically robust, an important property for developing this virus into a potential control agent for AAB.

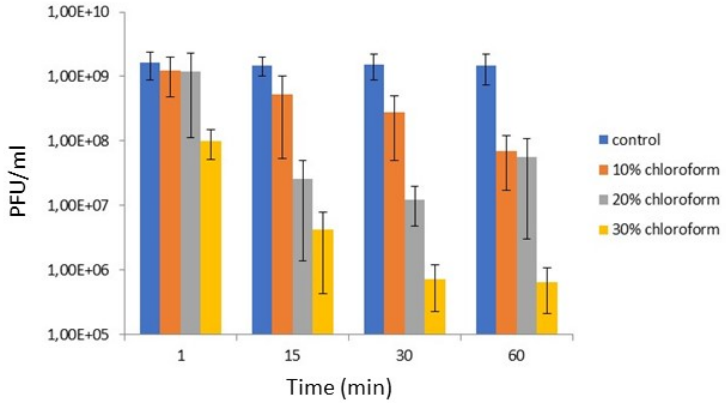


Figure 4. Sensitivity of BC1 to chloroform. The phage lysate was added with chloroform (10, 20 or 30%). After incubation for 1, 15, 30 or 60 min at room temperature, PFU were enumerated.

ORF function assignment and genomic organization

Analysis of the GC1 genome sequence revealed a total of 36 open reading frames (ORFs), most of which (24) were smaller than 100 codons. The vast majority of ORFs, 33 (92%), are found on the forward strand, and 3 (8%) are found on the opposite strand (**Fig. 5)**. The molecular G+C content of the GC1 genome is slightly lower than that of the first sequenced *G. cerinus* isolate (50.5% versus 55.68%, respectively) (Sainz *et al.*, 2016).

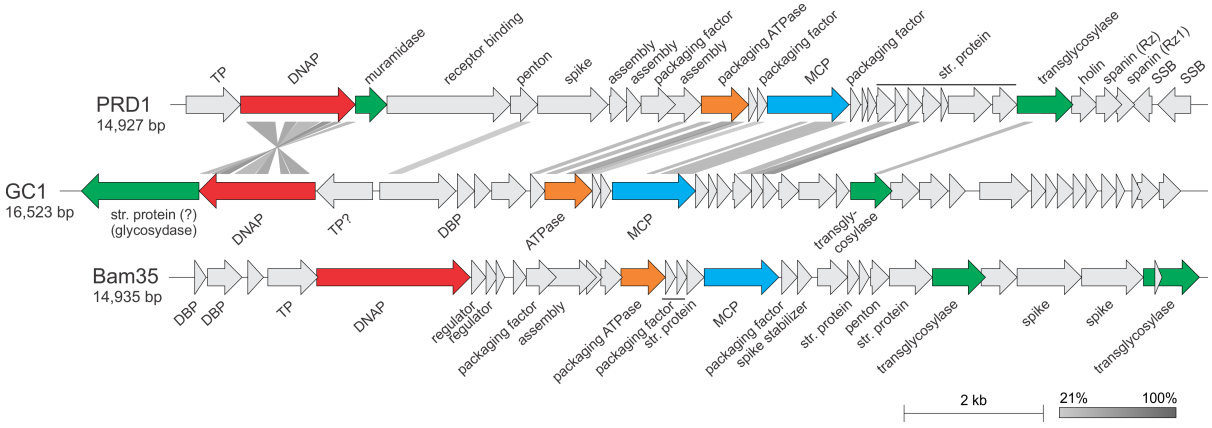


Figure 5. *Genome* maps and *protein identity comparison* between tectiviruses GC1, PRD1 and Bam35 generated using EasyFig (Sullivan *et al.*, 2011). ORFs filled in grey do not have homologs in either of the other two genomes.

Homology searches were performed using a combination of BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) as well as a more sensitive hidden Markov model (HMM)-based HHpred program (Söding *et al.*, 2005) and the CD-search against the Conserved Domains Database at NCBI (Marchler-Bauer and Bryant, 2004). Searches using the BLASTP program revealed that only eight (22%) of GC1 gene products are significantly similar (cutoff of E = $1e^{-03}$) to sequences in the nonredundant protein database (**Table S1**). The closest homologs for five of these proteins (ORFs 2, 9, 12, 16 and 17) were encoded by members of the genus *Alphatectivirus* (*Tectiviridae*). These included the key proteins involved in DNA replication (protein-primed family B DNA polymerase [DNAP]) as well as in virion structure and assembly (major capsid protein, genome packaging ATPase and two minor structural proteins). Considering the short length of most of the GC1 proteins, the BLASTP search database was restricted to the family *Tectiviridae* (taxid:10656). This adjustment resulted in identification of five additional putative homologs conserved between GC1 and alphatectiviruses (**Table S1**). The homologous genes occupied equivalent positions within the GC1 genome when compared to the genomic layout of other tectiviruses, with a notable inversion of the region encompassing the genes for the DNAP and putative terminal protein (**Fig. 5**), which in viral genomes is typically encoded immediately upstream of the DNAP (Redrejo-Rodriguez *et al.*, 2012).

Several GC1 proteins with no orthologues in known tectiviruses have been apparently recruited from diverse sources in the course of adaptation to the ecological niche or the host. For instance, ORF1 encodes a putative glycosydase, found in the tail-spike proteins of various tailed bacteriophages, where the glycosydase domain is responsible for depolymerization of the capsular polysaccharide during virus entry (Thompson *et al.*, 2006). Indeed, HHpred analysis identified the tail-spike proteins of bacteriophages HK620, LKA1, phi297 and K1-5 as homologs of the GC1 ORF1 with high probability (P>99%). ORF1 in GC1 genome is located downstream of the DNAP gene (**Fig. 5**). Notably, the corresponding position in other alphatectiviruses is occupied by a non-homologous but functionally equivalent gene encoding a muramidase (**Fig. 5**), which in bacteriophage PRD1 is a structural component of the virion (Rydman and Bamford, 2002). It is thus likely that the product of ORF1 represents a structural component of the GC1 virion assisting in virus penetration through the host cell envelope. Closest homologs of ORF1 are encoded by various alphaproteobacteria, including various *Gluconobacter* species, suggesting that ORF1 has been acquired by GC1 by horizontal gene transfer from its host.

Besides the above mentioned muramidase, most tectiviruses encode a second muralytic enzyme, a transglycosylase, which is also a structural component of the virion in PRD1-like

alphatectiviruses (Rydman and Bamford, 2002). HHpred analysis has shown that ORF22 is a divergent transglycosylase (P=99%; Table S1), which is encoded in the equivalent genomic locus as those of other tectiviruses (**Fig. 5**). Interestingly, however, the protein does not display detectable sequence similarity to the corresponding proteins of tectiviruses, but has closest homologs in bacteria, suggesting that during the evolution of tectiviruses the transglycosylase gene has undergone a non-orthologous replacement. Interestingly, ORF23 encodes a homolog of a structural protein of the corticovirus PM2, which has been previously noted to display a promiscuous distribution in various bacteriophages, including members of the order *Caudovirales* (Krupovic *et al.*, 2006).

Phylogenetic position of GC1 within the Tectiviridae

Sequence analysis of the GC1 gene products suggested that the virus is most closely related to PRD1-like phages of the genus *Alphatectivirus*. To formally explore this affiliation, we performed maximum likelihood phylogenetic analysis of the three key proteins – MCP, packaging ATPase and DNAP – conserved throughout the family *Tectiviridae.* In all cases, GC1 formed a well-supported sister group to the closely related PRD1-like tectiviruses, within the genus *Alphatectivirus* (**Fig. 6A-C**). Next, we calculated pairwise intergenomic distances between all sequenced tectiviruses with the Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) method using VICTOR tool (Meier-Kolthoff and Göker, 2017). This genome-wide comparison also placed GC1 as a sister group to PRD1-like tectiviruses (**Fig. 6D**). Notably, GC1 displays one of the highest intra-generic sequence divergences among members of the two genera. Indeed, GC1 displays only 45% overall sequence identity to PRD1, as calculated with EMBOSS Stretcher (https:/www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/), whereas pairwise comparison of GC1 with other alphatectiviruses using BLASTN, as recommended by the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee (PMID: 26733293), did not reveal common regions of sufficient similarity at the nucleotide level. Collectively, these results confirm that GC1 is a divergent member of the genus *Alphatectivirus*. Interestingly, GC1 helps to bridge the gap in the sequence space between alphatectiviruses and betatectiviruses. For instance, in a PSI-BLAST search seeded with the MCP sequence of GC1, all betatectiviruses were recovered after three iterations (E<0.01), whereas the leap to betatectiviruses was not possible when the search was seeded with the MCP sequence of PRD1-like phages.

Conclusions

During a survey of bacteriophages infecting wine-associated AAB, we identified and characterized bacteriophage GC1, a highly divergent member of the genus *Alphatectivirus*. GC1 displays unique life-style features among alphatectiviruses. For instance, we could demonstrate that GC1 enters a lysogenic state in *G. cerinus*. Gillis and Mahillon (2014b) have investigated the influence of temperate betatectiviruses GIL01 and GIL16 on certain life traits of *B. thuringiensis* serovar israelensis. Lysogeny was shown to have a significant influence on the bacterial growth, sporulation rate, biofilm formation, and swarming motility of *B. thuringiensis*, all of which are traits involved in the survival and colonization of this bacterium in different environmental habitats. Studies are now in progress to assess the role of such interactions in the persistence of AAB during wine making. Because *G. cerinus* is a commensal bacterium of the gut of *Drosophila melanogaster* (Roh *et al.*, 2008), future work should also consider the role of lysogeny in the interactions between gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster* (Buchon *et al.*, 2013), and possible influence on the fruit fly's behavior (Fischer *et al.*, 2017).

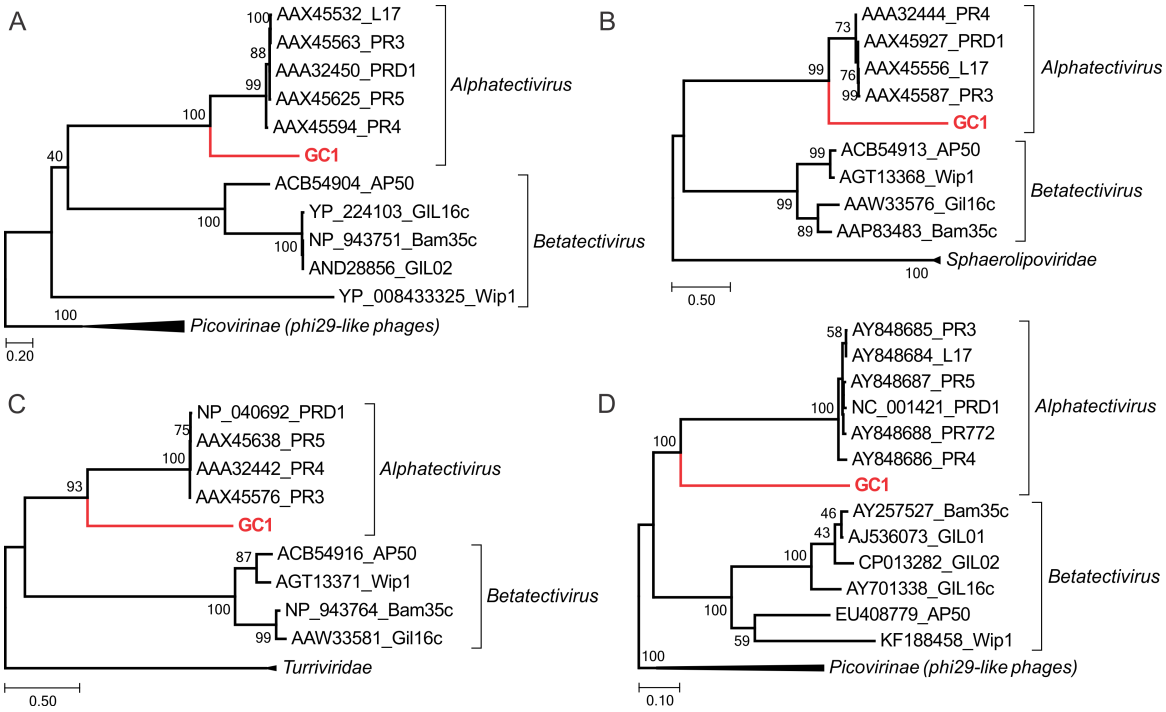


Figure 6. Phylogenetic relationship of GC1 compared with other tectiviruses based on the three conserved proteins: the major capsid protein (A), packaging ATPase (B) and DNAP (C). Phylogenetic tree computed using the Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP) strategy (D).

Supplementary Materials: Table S1. Summary of the general features of *G. cerinus* phage GC1.

Acknowledgments: Support for this project was provided by the French ANR (grants ANR-10-INBS-04-01 to the national infrastructure France BioImaging and ANR-14-CE20-0007 to the Enology group).

Author contribution: C.L.M., C.P. and F.J. conceived and designed the experiments; C.P., M.P. and F.J. performed the experiments; C.L.M., F.J., O.C. and M. K. analyzed the data; C.P., F.J. and O.C. contributed to reagents/materials/analysis tools; and C.L.M. and M.K. wrote the paper.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

Abrescia, N.G.; Cockburn, J;J.; Grimes, J.M.; Sutton, G.C.; Diprose, J.M.; Butcher, S.J.; Fuller, S.D.; San Martín, C.; Burnett, R.M.; Stuart, D.I.; Bamford, D.H.; Bamford J.K. Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature* 2004, *432,* 68-74.

Ackermann, H.W.; Prangishvili, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch. Virol*., 2012, 157, 1843-1849.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*., 1997, *25*, 3389-3402.

Bamford, D.H.; Caldentey, J.; Bamford, J.K. Bacteriophage PRD1: a broad host range DSDNA tectivirus with an internal membrane. *Adv. Virus Res*., 1995, *45*, 281-319.

Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V.; Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A.; Pevzner, P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 2012, 19, 455-77.

Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol*., 2012, *154*, 152-61.

Barbe, J.C.; De Revel, G.; Joyeux, A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. Role of botrytized grape micro-organisms in SO_2 binding phenomena. *J. Appl. Microbiol*., 2001, *90*, 34-42.

Bartowsky, E. J.; Henschke, P.A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - a review. *Int. J. Food Microbiol*., 2008, *125*, 60-70.

Berjón-Otero, M.; Villar, L.; de Vega, M.; Salas, M.; Redrejo-Rodríguez, M. DNA polymerase from temperate phage Bam35 is endowed with processive polymerization and abasic sites translesion synthesis capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 2015, *112*, E3476-3484.

Berjón-Otero, M.; Lechuga, A.; Mehla, J.; Uetz, P.; Salas, M.; Redrejo-Rodríguez, M. Bam35 tectivirus intraviral interaction map unveils new function and localization of phage ORFan proteins. *J. Virol*., 2017, *26*, pii: JVI.00870-17.

Bertozzi-Silva, J.; Sauvageau, D. Bacteriophages as antimicrobial agents against bacterial contaminants in yeast fermentation processes. *Biotechnol. Biofuels*, 2014, *7*, 123.

Bokulich, N.A.; Joseph, C.M.; Allen, G.; Benson, A.K.; Mills, D.A. Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLoS ONE*, 2012, *7*, e36357.

Buchon N, Broderick NA, Lemaitre B. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Microbiol*., 2013, *11*, 615-626.

Butcher, S.J.; Manole, V.; Karhu, N.J. Lipid-containing viruses: bacteriophage PRD1 assembly. *Adv. Exp. Med. Biol*., 2012, *726*, 365-377.

Capella-Gutiérrez, S.; Silla-Martínez, J.M.; Gabaldón, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 2009, *25*, 1972-1973.

Das, M.; Bhowmick, T.S.; Ahern, S.J.; Young, R.; Gonzalez, C.F. Control of Pierce's Disease by Phage. *PLoS ONE*, 2015, *10*, e0128902.

De Vuyst, L.; Weckxx, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J. Appl. Microbiol*., 2016, *121*, 5-17.

Fischer, C.N., Trautman, E.P., Crawford, J.M., Stabb, E.V., Handelsman, J., Broderick, N.A. Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence *Drosophila behavior*. *Elife*, 2017, *9*, 6.

Fornelos, N.; Butala, M.; Hodnik, V.; anderluh, G.; Bamford, J.K.; Salas, M. Bacteriophage GIL01 gp7 interacts with host LexA repressor to enhance DNA binding and inhibit RecA-mediated auto-cleavage. *Nucleic Acids Res.*, 2015, *43*, 7315-29.

Gaidelyte, A.; Jaatinen, S.T.; Daugelavicius, R.; Bamford, J.K.; Bamford, D.H. The linear double-stranded DNA of phage Bam35 enters lysogenic host cells, but the late phage functions are suppressed. *Bacteriol*., 2005, *187*, 3521-3527.

Gaidelyte, A.; Cvirkaite-Krupovic, V.; Daugelavicius, R.; Bamford, J.K.; Bamford, D.H. The entry mechanism of membrane-containing phage Bam35 infecting *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol*., 2006, *188*, 5925-5934.

Gillis, A.; Mahillon, J. Prevalence, genetic diversity, and host range of tectiviruses among members of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol*., 2014, *80*, 4138-52.

Gillis, A.; Mahillon, J. Influence of lysogeny of Tectiviruses GIL01 and GIL16 on *Bacillus thuringiensis* growth, biofilm formation, and swarming motility. *Appl. Environ. Microbiol*., 2014b, *80*, 7620-7630.

Gillis, A.; Bin Jang, H.; Mahillon, J.; Kuhn, J.H.; Kropinski, A.M.; Adriaenssens, E.; Lavigne, R. ICTV taxonomic proposal 2017. 013B.U.v1. In the family Tectiviridae, change the name of genus Tectivirus to Alphatectivirus and create a new genus, Betatectivirus. International Committee on Taxonomy in Viruses (ICTV), 2017. Available online: https://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_prokaryote1/m/bact02/69222017 (assessed on 20 October 2017).

Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel; O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol*., 2010, *59*, 307-321.

Howard-Varona, C.; Hargreaves, K.R.; Abedon, S.T.; Sullivan, M.B. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J*., 2017, *11*, 1511-1520. Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Blanche-Barbat, M.;

Petrel, M.; Ballestra, P.; Le Marrec C. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni. Food Microbiol*., 2016, *54*, 167–177.

Jakob, F.; Pfaff, A.; Novoa-Carballal, R.; Rübsam, H.; Becker, T.; Vogel, R.F. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydrate Polymers*, 2013, *92*, 1234-1242.

Jalasvuori, M.; Palmu, S.; Gillis, A. ; Kokko, H. ; Mahillon, J. ; Bamford, J.K.; Fornelos N. Identification of five novel tectiviruses in *Bacillus* strains: analysis of a highly variable region generating genetic diversity. *Res. Microbiol*., 2013, *164*, 118-126.

Joyeux, A.; Lafon-Lafourcade, S. ; Ribéreau-Gayon, P. Evolution of acetic Acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol*., 1984, *48*, 153-156.

Kiesel, B.; Wünsche, L.J. Phage Acm1-mediated transduction in the facultatively methanol-utilizing *Acetobacter methanolicus* MB 58/4. *J. Gen. Virol*., 1993, *74*, 1741-1745.

Koonin, E.V.; Krupovic, M. Polintons, virophages and transpovirons: a tangled web linking viruses, transposons and immunity. *Curr. Opin. Virol*., 2017, *25*, 7-15.

Krupovic, M; Vilen, H.; Bamford, J.K.; Kivelä, H.M.; Aalto, J.M.; Savilahti, H.; Bamford, D.H. Genome characterization of lipid-containing marine bacteriophage PM2 by transposon insertion mutagenesis. *J. Virol*., 2006, *80*, 9270-9278.

Krupovic, M.; Cvirkaite-Krupovic, V.; Bamford, D.H. Identification and functional analysis of the Rz/Rz1-like accessory lysis genes in the membrane-containing bacteriophage PRD1. *Mol.Microbiol*., 2008, *68*, 492-503.

Krupovic, M.; Bamford. D.H. Virus evolution: how far does the double beta-barrel viral lineage extend? *Nat. Rev. Microbiol*., 2008, *6*, 941-8.

Krupovic, M.; Koonin, E.V. Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nat. Rev. Microbiol*., 2015, *13*, 105-15.

Laurinavicius, S.; Käkelä, R.; Somerharju, P.; Bamford, D.H. Phospholipid molecular species profiles of tectiviruses infecting Gram-negative and Gram-positive hosts. *Virology*, 2004, *322*, 328-336.

Laurinmäki, P.A.; Huiskonen, J.T.; Bamford, D.H.; Butcher, S.J. Membrane proteins modulate the bilayer curvature in the bacterial virus Bam35. *Structure*, 2005, *13*, 1819-1828.

Liu, M.; Bischoff, K.M.; Gill, J.J.; Mire-Criscione, M.D.; Berry, J.D.; Young, R.; Summer, E.J. Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics disrupted by *Lactobacillus fermentum. Biotechnol. Biofuels*, 2015, *8*, 132.

Mas, A.; Torija, M.J.; García-Parrilla Mdel, C.; Troncoso, A.M. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *Scientific World J*., 2014, 394671.

Mateo, E.; Torija M.J.; Mas A.; Bartowsky, E.J. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *Int. J. Food Microbiol*., 2014, 178, 98–106.

Marchler-Bauer, A.; Bryant, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*., 2004, *32*, W327-331.

Meier-Kolthoff, J.P.; Göker, M. VICTOR: Genome-based Phylogeny and Classification of Prokaryotic Viruses. *Bioinformatics*, 2017 (in press).

Navarro, D.; Mateo, E.; Torija, M.J.; Mas, A. Acetic acid bacteria in grape must. *Acetic Acid Bacteria*, 2013, 2, e419-23.

Oksanen, H.M. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Corticoviridae. *J.Gen. Virol*., 2017, *98*, 888-889.

Pawlowski, A.; Rissanen, I.; Bamford, J.K.; Krupovic, M.; Jalasvuori, M. Gammasphaerolipovirus, a newly proposed bacteriophage genus, unifies viruses of halophilic archaea and thermophilic bacteria within the novel family Sphaerolipoviridae. *Arch. Virol.*, 2014, *159*, 1541-54.

Pei, J.; Grishin, N.V. PROMALS3D: multiple protein sequence alignment enhanced with evolutionary and three-dimensional structural information. *Methods Mol. Biol.*, 2014, *1079*, 263-271.

Peralta, B.; Gil-Carton, D.; Castaño-Díez, D.; Bertin, A.; Boulogne, C. ; Oksanen, H.M.; Bamford, D.H.; Abrescia, N.G. Mechanism of membranous tunnelling nanotube formation in viral genome delivery. *PLoS Biol.*, 2013, *11*, e1001667.

Philippe, C.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Laforgue, R.; Maupeu, J.; Petrel, M.; Le Marrec, C. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, *257*,138-147.

Pinto, C.; Pinho, D.; Cardoso, R.; Custódio, V.; Fernandes, J.; Sousa, S.; Pinheiro, M.; Egas, C.; Gomes, A.C. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol*., 2015, *6*, 905.

Portillo, M.; Mas, A. Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT Food Sc. and Technol.*, 2016, *72*, 317–321.

Pothakos, V.; Illeghems, K.; Laureys, D.; Spitaels, F.; Vandamme, P.; De Vuyst, L. Acetic Acid Bacteria in Fermented Food and Beverage Ecosystems. In Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology. Matsushita, K.; Toyama, H.; Tonouchi, N.; Okamoto-Kainuma, A., Eds.; Springer New York: New York, NY, USA, 2016; pp. 73-99; ISBN 978-4-4-431-55931-3.

Raspor, P.; Goranovic, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol*., 2008, *28*,101-24.

Ravantti, J.J.; Gaidelyte, A.; Bamford, D.H.; Bamford, J.K. Comparative analysis of bacterial viruses Bam35, infecting a gram-positive host, and PRD1, infecting gram-negative hosts, demonstrates a viral lineage. *Virology*, 2003, *313*, 401-414.

Redrejo-Rodríguez, M.; Muñoz-Espín, D.; Holguera, I.; Mencía, M.; Salas, M. Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA*, 2012, *109*, 18482-18487.

Redrejo-Rodríguez, M.; Salas, M. Multiple roles of genome-attached bacteriophage terminal proteins. *Virology*, 2014, *468*, 322-329.

Rydman, P.S.; Bamford, D.H. The lytic enzyme of bacteriophage PRD1 is associated with the viral membrane. *J. Bacteriol*., 2002, *184*, 104-10.

Robakis, N.K.; Palleroni, N.J.; Despreaux, C.W.; Boublik, M.; Baker, C.A.; Churn, P.J.; Claus, G.W. Isolation and characterization of two phages for *Gluconobacter oxydans. J. Gen. Microbiol*., 1985, 131, 2467–2473.

Roh, S.W.; Nam, Y.D.; Chang, H.W.; Kim K.H.; Kim, M.S.; Ryu, J.H.; Kim, S.H.; Lee, W.J.; Bae, J.W. Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, *74*, 6171-6177.

Sainz, F.; Mas, A.; Torija, M.J. Draft genome sequences of *Gluconobacter cerinus* CECT 9110 and *Gluconobacter japonicus* CECT 8443, acetic acid bacteria Isolated from grape must, *Genome Announc*., 2016, *4*, e00621-16.

Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning*: *A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001.

Saren, A.M.; Ravantti, J.J.; Benson, S.D.; Burnett, R.M.; Paulin, L.; Bamford, D.H.; Bamford, J.K. A snapshot of viral evolution from genome analysis of the tectiviridae family. *J. Mol. Biol*., 2005, *350*, 427-440.

Schocher, A.J.; Kuhn, H.; Schindler, B.; Palleroni, N.J.; Despreaux, C.W.; Boublik, M.; Miller, P.A. *Acetobacter* bacteriophage A-1. *Archiv. Microbiol*., 1979, *121*, 193–197.

Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics,* 2014, *30*, 2068-2069.

Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 2005,, W244-W248.

Stamm, W.W.; Kittelmann, M.; Follmann, H.;Trüper, H.G. The occurrence of bacteriophages in spirit vinegar fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 1989, *30*, 41–46.

Sullivan, M.J.; Petty, N.K.; Beatson, S.A. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 2011, *27*, 1009-1010.

Thompson, J.E.; Pourhossein, M.; Waterhouse, A.; Hudson, T.; Goldrick, M.; Derrick, J.P.; Roberts, I.S. The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *J. Biol. Chem*., 2010, *285*, 23963-23969.

Ua-Arak, T.; Jakob F.; Vogel, R.F. Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat-sourdough breads. *Food Microbiol*., 2017, *65*, 95-104.

Valera, M.J.; Sainz, F.; Mas, A. ; Torija, M.J. Effect of chitosan and SO_2 on viability of *Acetobacter* strains in wine. *Int. J. Food Microbiol*., 2017, *246*, 1-4.

Wang, Y.; Qian, PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, 2009; *4*, e7401.

Worley-Morse, T.O.; Deshusses, M.A.; Gunsch, C.K. Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages. *Biotechnol. Bioeng*., 2015, *112*, 1544-53.

Zinno, P.; Janzen, T.; Bennedsen, M.; Ercolini, D.; Mauriello, G. Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from mozzarella cheese plants. *Int. J. Food Microbiol*., 2010, *138*, 137-44.

Table S1. Summary of the general features of *G. cerinus* phage GC1

N° CDS	Size(aa)	Strand	Putative function	Conserved domain	BBH (Source, accession)	identical/total; % id	e-value
1	559	-	Hypothetical protein	rhamnogalacturonase, glycosydase domain (1RMG, P=99.6), likely receptor-binding protein	Hypothetical protein (*Gluconobacter oxydans*, WP_062494220.1)	135/529; 26	2e-29
2	561	-	DNA polymerase	DNA_pol_B_2 (pfam03175)	DNA polymerase (phage PRD1, NP_040682.1)	235/571; 41	1e-130
3	271	-	Hypothetical protein	-	-	-	-
4	367	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
5	86	+	Hypothetical protein	HTH DNA-binding protein (3F8M, P=90)	-	-	-
6	74	+	Hypothetical protein	-	Assembly protein PRD1-P10, fragment (phage PRD1, gi|61394104|AAX45904.1)	26/61; 43	0.03
7	169	+	Hypothetical protein	-	Packaging efficiency factor PRD1-P6 (Enterobacteria phage L17, AAX45553)	36/116; 31	0.003
8	75	+	Hypothetical protein		Assembly protein PRD1-P10, fragment (Enterobacteria phage PR4, AAA32443)	28/65; 43	4e-08
9	225	+	DNA packaging ATPase	-	DNA packaging ATPase PRD1-P9 (phage PRD1, NP_040689.1)	95/231; 41	2e-56
10	40	+	Hypothetical protein	-	PRD1-P10 (Salmonella virus PRD1, NP_040690)	11/31, 35	5e-04
11	46	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
12	399	+	Major capsid protein	Phage_Capsid_P3 (pfam09018)	Chain A, P3, The Major Coat Protein (phage PRD1, 1HX6_A)	120/377; 32	8e-43
13	63	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
14	38	+	Hypothetical protein	-	PRD1-gpx (Salmonella virus PRD1, YP_001542610)	10/16, 63	0.019
15	63	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
16	87	+	Hypothetical protein		DNA delivery protein, PRD1-P18 (phage PRD1, gi|61394111|AAX45911.1)	25/85; 29	6e-10
17	55	+	Hypothetical protein	PRD1_DD phage membrane DNA delivery (pfam11087)	DNA delivery protein, PRD1-P32 (phage PRD1, YP_001542612)	28/53; 53	1e-07
18	71	+	DNA delivery protein	PRD1_DD phage membrane DNA delivery (pfam11087)	DNA delivery protein, PRD1-P34 (phage PRD1, NP_040696)	31/53; 58	
19	96	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
20	180	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
21	61	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
22	199	+	Peptidase	Lytic transglycosylase (4C5F, P=99.4)	hypothetical protein (*Paenibacillus herberti*, WP_089524389.1)	33/77; 43	8e-04
23	135	+	Structural protein	Virion protein (PHA02564)	Structural protein (*Klebsiella aerogenes*, WP_032708580.1) Structural protein P5 (Pseudoalteromonas phage PM2, NP_049909)	60/130; 46 49/133; 37	4e-30 3e-19
24	137	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
25	76	+	Hypothetical protein		-	-	-
26	225	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
27	68	+	Hypothetical		-	-	-

N° CDS	Size(aa)	Strand	Putative function	Conserved domain	BBH (Source, accession)	identical/total; % id	e-value
			protein				
28	55	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
29	81	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
30	59	+	Hypothetical protein	-			
31	57	+	Hypothetical protein	-	Hypothetical protein OR214_00015 (*Ralstonia pickettii* OR214, ENZ79599.1)	18/39; 46	0.01
32	69	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
33	45	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
34	38	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
35	92	+	Hypothetical protein	-	-	-	-
36	97	+	Hypothetical protein	-	Hypothetical protein (*Acetobacter persici*, WP_077932138.1)	25/106; 24	0.017

Conclusion du chapitre I

Le premier objectif de ce travail de thèse était de poursuivre la caractérisation des phages infectant *O. oeni* dans le continuum moût-fermentations-élevage. L'approche déployée, basée sur deux protocoles complémentaires, a permis d'isoler 136 oenophages à partir d'échantillons représentant différents cépages, domaines, types de vin et étapes du procédé de vinification. Notre stratégie s'est basée sur la mise en évidence de phages actifs en utilisant le test classique de la double-couche, et la souche IOEB S277 a été utilisée comme hôte. Cette souche appartient au groupe phylogénétique A défini par MLST (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Jaomanjaka (2014) a réalisé des études de spectre d'hôte et a montré que toutes les souches sensibles aux phages isolés lors de sa thèse faisaient partie de ce même groupe MLST. Il est possible que l'utilisation exclusive de la souche *O. oeni* IOEB S277 limite notre approche et sélectionne uniquement certains phages au sein des populations phagiques évoluant dans l'écosystème. Une première démonstration de ce biais a été obtenue sur le millésime 2017. Un échantillon de moût de blanc a été analysé en recherche directe en utilisant deux souches sensibles différentes : IOEB S277 (MLST groupe A) et S12 (groupe MLST B) (Favier, 2012). Seule la souche S12 a montré la présence de plages. Il sera donc important à l'avenir de tester la présence d'oenophages en présence de plusieurs souches, en utilisant des isolats (i) résistants aux phages déjà isolés par exemple, ou bien (ii) représentant des groupes génétiques différents (MLST B and C) ou encore (iii) d'origine (type de vins) différente. Par ailleurs, nous pouvons également à l'avenir légèrement modifier le protocole 1 en augmentant la taille des pores des filtres utilisés (0,45 µm ou 0,8 µm), et proposer un troisième type de protocole dans lequel l'échantillon sera inoculé en bouillon MRS, simultanément avec une ou plusieurs souches sensibles.

Au sein de la collection de 136 phages, certains ont pu être affiliés aux groupes A, B, C et D décrits par le passé. Une analyse moléculaire plus poussée devra être réalisée afin de savoir s'il s'agit d'espèces nouvelles par rapport aux données actuellement disponibles sur les phages tempérés. L'originalité de nos travaux se traduit par l'isolement de phages atypiques (i) ne répondant pas aux séquences conservées identifiées dans les gènes d'intégrase des oenophages tempérés et (ii) et formant de larges plages claires. Ceci suggère la présence dans l'écosystème de phages purement lytiques, dont la présence n'a pas été détectée jusqu'à présent. L'analyse moléculaire de ces phages permettra de comprendre leur histoire évolutive par rapport aux oenophages tempérés. Ces aspects seront développés dans le chapitre 2.

Les résultats montrent que globalement les phages sont présents lors des vinifications sans problèmes particuliers, et que des particules actives sont notamment associées au moût et à la FML. Le suivi cinétique mené en 2015 fait le lien entre l'évolution des populations phagiques et bactériennes, suggérant que la lysogénie a un rôle de réservoir. Si les phages non ABCD s'avèrent lytiques, leur source restera à préciser.

La caractérisation des niveaux de populations ainsi que la compréhension des rôles et impacts des phages lors des vinifications restent délicates, et les outils développés dans ce travail ne permettent qu'une vision parcellaire de la situation. En effet l'approche ne détecte pas (i) les phages qui n'infectent pas *O. oeni* IOEB S277, et (ii) ceux dont l'activité a été perdue en raison des conditions physico-chimiques difficiles associées au vin. En effet, de nombreux facteurs, à commencer par le pH, l'éthanol et le SO_2 inactivent les particules lors de la vinification. La connaissance moléculaire des phages isolés sera une première avancée et elle devrait permettre de développer des outils de suivi de type qPCR/PCR digitale. Des approches métagénomiques pourraient être développées en parallèle. Le préambule sera la mise au point de techniques permettant la concentration des particules et la séparation de la fraction virale à partir d'échantillons œnologiques, avant leur séquençage. Ces outils permettront de mieux comprendre comment les phages agissent sur la population bactérienne en cours du processus de vinification, et de préciser leur impact éventuel sur la sélection des souches retrouvées à l'étape de FML. Une attaque virale peut bloquer le déroulement de la FML, où le ralentir, laissant la place à d'autres flores dépréciatrices de la qualité du vin. Dans l'échantillonnage de 2015, aucune vinification n'a montré de délai ou d'échec de vinification. Seuls deux échantillons collectés en 2014 ont montré une population plus forte que la moyenne en phages actifs ainsi qu'une population de BL inférieure au seuil requis pour déclencher la FML. Contrairement aux études pionnières réalisées par Sozzi, le phage est un acteur commun de l'écosystème. Ce n'est donc pas la présence de phages qui peut indiquer une attaque virale et un éventuel impact sur la qualité future du vin, mais plutôt une concentration supérieure à 10^5 UFP/ml.

CHAPITRE II

Diversité génomique des oenophages

Avant-propos

Les travaux de génomique menés au laboratoire ont montré que l'intégration et la dégradation des phages au sein des génomes bactériens constituent un flux de gènes promouvant la diversification génétique de leurs hôtes. Tous les oenophages caractérisés à ce jour sont tempérés ou ex-tempérés, et partagent une même architecture de leurs génomes. Les comparaisons des séquences nucléotidiques montrent une situation complexe. Un premier cluster rassemble tous les phages possédant une intégrase de type D (et est nommé cluster D). Le terme « cluster » traduit l'existence de groupes de phages (i) dont la synténie des génomes est conservée et (ii) qui présentent un pourcentage d'identité nucléotidique fort (ANI). Chez les mycobactériophages la valeur retenue est ≥ 50% (Hatfull *et al.*, 2010). Les membres du cluster D partagent peu d'identité nucléotidique (principalement au niveau du gène codant l'endolysine) avec les phages abritant des intégrases de type A, B et C. Les phages de type ABC possèdent des génomes caractérisés par un mosaïcisme important et de multiples échanges de séquences au sein des différents modules fonctionnels. La répartition des phages ABC au sein de différents « clusters » est probable et la démonstration nécessite des analyses bio-informatiques plus poussées. Dans ce travail, nous avons utilisé le terme de super-groupe ABC, pour distinguer les phages n'appartenant pas au cluster D. Il est intéressant de noter qu'outre l'absence d'homologie nucléotidique avec les phages du super-groupe ABC, les membres du cluster D montrent d'autres spécificités comme la position particulière des prophages dans le réplicore gauche du génome bactérien. De plus, ces prophages sont plus fréquemment associés à des souches bactériennes affiliées au groupe phylogénétique MLST B. Au niveau du cycle de vie, les phages de type D se distinguent également de ceux du super-groupe ABC par un mode de packaging de type *pac* (versus *cos* dans le super-groupe ABC, ainsi par une stabilité accrue de la lysogénie (Jaomanjaka, 2014).

Dans le chapitre I, nous avons isolé 136 oenophages dont 98 sont *a priori* tempérés, et possèdent une intégrase de type A, B, C ou D. L'approche déployée a également mis en évidence des phages n'appartenant pas au super-groupe ABC ni au cluster D. Leur capacité à former des plages très claires et l'absence de réponse de leur génome aux PCR spécifiques des intégrases orientent vers la présence d'oenophages strictement lytiques et la question de leur appartenance à un nouveau cluster est posée. **Nos objectifs dans ce chapitre** sont d'analyser rapidement la diversité génomique au sein du panel des 136 phages isolés. Il s'agit (i) d'identifier les phages qui présentent des génomes originaux par rapport aux oenophages tempérés déjà caractérisés au laboratoire, et (ii) de procéder à leur séquençage. Grâce à une analyse de génomique comparative, nous avons mis au point un outil

de typage rapide basé sur la PCR, capable d'apprécier la diversité dans le cluster D et le super groupe ABC. L'outil a été appliqué aux phages isolés lors du millésime 2014, et nous avons procédé au séquençage des génomes originaux. Enfin, les phages produisant des plages claires nommés « non-ABCD » isolés au cours des millésimes 2014 et 2015 ont également été caractérisés. La dernière partie du chapitre présente une vue d'ensemble de la diversité et quelques éléments traduisant l'histoire évolutive des oenophages.

Partie I. Outils de typage rapide des oenophages tempérés

1. Le système de typage rapide des phages à Intégrase de type A

Les bactériophages à intégrase A (ou phages A) sont fréquents dans les inventaires réalisés au laboratoire. Ces phages partagent typiquement des régions de très grande identité de séquences et des régions très différentes. Ces régions très similaires ou très dissimilaires correspondent généralement à des modules de gènes impliqués dans des fonctions semblables (Casjens and Hendrix, 1974). Sur la base de ces observations, un schéma de typage rapide a été mis au point par Jaomanjaka (2014). Il permet grâce à un ensemble de 14 réactions PCR de sous-typer finement les prophages et les phages libres possédant une intégrase de type A (**Figure 29**).

Grâce à la comparaison des génomes, il a été observé qu'une fonction donnée est assurée par des protéines de séquences différentes au sein des membres du groupe A. Ainsi dans le module d'empaquetage, chaque phage A possède et exprime une terminase particulière parmi un ensemble de quatre protéines identifiées (TerS1, TerS2, TerS3 et TerS4). Les séquences *terS* sont parfaitement conservées au sein de chaque sous-groupe, permettant ainsi de définir quatre couples d'amorces.

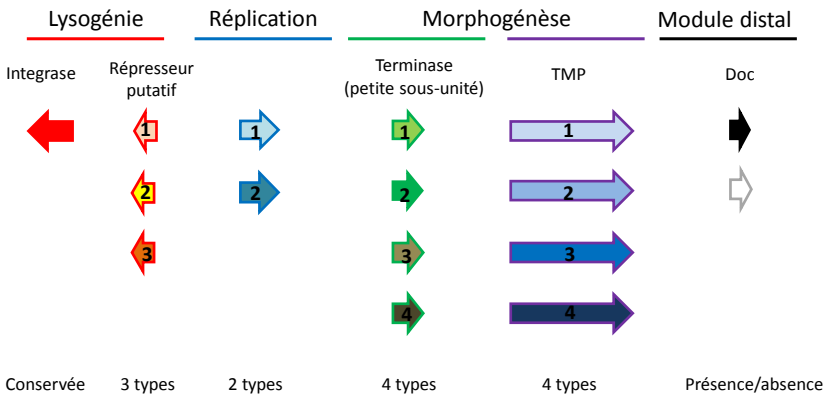


Figure 29. Principe du schéma de sous-typage des phages A proposé par Jaomanjaka *et al.* (2014). Les gènes retenus sont ceux codant pour une protéine du module de réplication, la protéine TerS, la TMP ainsi que la protéine Doc associée aux morons des phages.

Les mêmes observations ont été faites pour une autre protéine essentielle à l'empaquetage, la Tape Measure Protein (TMP), dont quatre types sont recensés dans le groupe A (Tmp1, Tmp2, Tmp3 et Tmp4). Les comparaisons des génomes ont été étendues au module de lysogénie, où trois organisations caractéristiques ont été observées. Chacune se caractérise par une signature qui

correspond à la présence d'une courte *orf*, située sur le même brin et à proximité du gène *int*. Les protéines déduites ne partagent pas d'homologie entre elles, mais ont des caractéristiques communes aux protéines de la famille des répresseurs LexA. Elles ont été nommées CI_1, CI_2 et CI_3. Enfin, dans le module de réplication, deux types d'organisation sont trouvés et chacun est représenté par l'une des deux protéines nommées Rep1 et Rep2. Malgré le fait qu'aucun rôle précis n'ait été associé à ces protéines par comparaison de séquence lors de l'annotation, leur distribution permet une ségrégation des phages en deux groupes. Enfin, les phages A se distinguent selon la présence ou l'absence d'un gène *doc* (death-on-curing) dans le module distal. Associé au cadre de lecture suivant, il constitue potentiellement un système toxine-antitoxine (TA) (ou module d'addiction, Van & Saavedra, 2009). Chez certains oenophages de type A, le module distal contient des gènes nommés "morons". Le terme fait référence à une addition de matériel génétique qui interrompt des opérons et des modules fonctionnels ("more on" en anglais) (Hendrix *et al.*, 2000).

La réalisation des 14 réactions de PCR a permis à Jaomanjaka (2014) de mettre en évidence 8 sous-types nommés A1 à A8 parmi les prophages. Le typage de phages isolés de vins rouges de Pauillac a complété l'analyse et trois phages (OE33PA3, OE33PA6 et OE33MC1) ont montré des organisations nouvelles, nommées A9, A10 et A11 (**Tableau XXVII**). Les phages A sont donc extrêmement variables et le groupe comptait en 2014 au moins 11 sous-types (parmi les 192 combinaisons statistiquement envisageables). Nous avons observé que les phages portant les gènes cI_3, $terS_3$, $terS_4$ et tmp_4 sont rares dans le panel étudié, et sont portés par les deux prophages 0502 (non inductible) et 0608 (inductible).

Tableau XXVIII. Sous-typage des phages portant une intégrase de type A (Jaomanjaka, 2014)

	cI	Rep	TerS	TMP	Doc	type
Prophages connus						
ϕ0608	1*	1*	3*	3*	+*	A1
ϕ Awri548/ϕ0205/ϕB16	1	1	1	1	+	A2
ϕ0501	2	2	1	1	-	A3
ϕS161*/ϕS28/ϕS22	2	2	2	2	-	A4
ϕ Awri568/ϕL26–1/ Awri 429/ Awri 576	2*	2*	1*	2*	-	A5
ϕ Awri 422	2	2	2	1	+	A6
ϕ0502	3*	1	4*	4*	-	A7
ϕ1491	2	1	2*	1*	-	A8
Phages libres connus (2014)						
OE33PA3 (S161)	1	1	2	2	+	A9
OE33PA6 (S28)	1	1	2	2	-	A10
OE33MC1	2	1	1	2	-	A11

* séquences protéiques modèles utilisées pour la recherche *in silico,* par blastp.

2. Evolution vers un schéma intégré de typage rapide des membres du super-groupe ABC

2.1. Origine des nouvelles données de séquençage analysées (2014-2017)

Au cours des travaux antérieurs, le nombre de génomes séquencés disponibles dans l'espèce *O. oeni* était de 50, et leur analyse a permis la comparaison de 36 prophages (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Le nombre de génomes séquencés dans l'espèce a progressé constamment et atteint aujourd'hui le nombre de 203 (Bartowsky, 2017). Les différents assemblages sont disponibles sur la base de données du NCBI, et correspondent à des souches isolées en France (CRBO), en Australie (AWRI), en Italie (OM), en Argentine et au Chili. Le génome de référence est celui de la souche PSU-1 et les génomes additionnels sont accessibles sous forme de contigs. La qualité du travail d'assemblage est supérieure pour les génomes les plus récents séquencés par approche Illumina, et les analyses de recherche des prophages sont facilitées lorsque le nombre de contigs reste inférieur à 50. Cela a été notamment le cas pour les souches CRBO dont les assemblages ont été réalisés au laboratoire par Hugo Campbell-Sills et Patrick Lucas. Dans le cas contraire (plus de 200 contigs), les souches n'ont pas été exploitées dans le cadre de cette étude. Nous avons finalement retenu une soixantaine de souches supplémentaires et l'identification de leurs prophages a été obtenue grâce à l'outil PHASTER (http://phaster.ca/), qui permet d'identifier et de rapidement annoter les séquences prophagiques dans les génomes bactériens (**Tableau XIV**). Au total, un ensemble de 64 séquences complètes de prophages supplémentaires ont été identifiées à partir de ce nouveau panel de souches. Les prophages se répartissent dans le cluster D (n=13) et le super-groupe ABC [A (n=17), B (n=13), et C (n=21)]. L'intégration site-spécifique de ces prophages identifiés dans les génomes a été vérifiée par PCR *in-silico* (jonctions *attL*) et une parfaite corrélation entre le type d'intégrase (A, B, C ou D) et la position du site d'attachement dans le chromosome bactérien ($attB_A$, $attB_B$, $attB_C$, $attB_D$) a été observée. A l'issue de cette analyse, nous avons donc disposé d'un nouvel ensemble de 86 séquences de prophages de cluster D (n=18) et de super-groupe ABC [A (n=29), B (n=15), et C (n=24)].

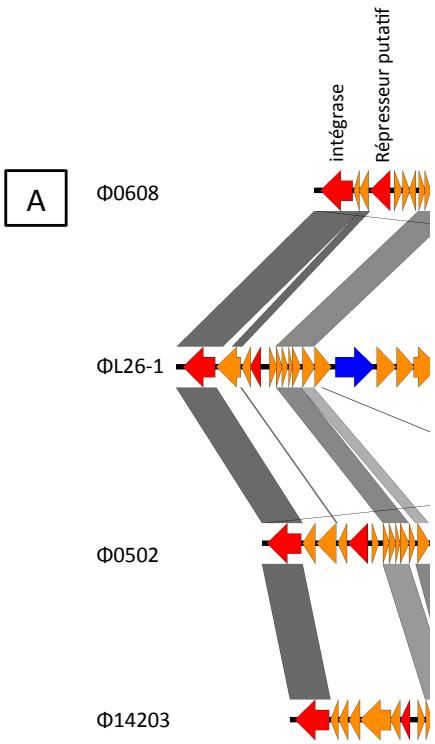
Ce premier travail confirme donc (i) le nombre de sites d'attachement et leur localisation dans le génome de *O. oeni*, et (ii) la relation entre un site donné et une séquence particulière de l'intégrase. Récemment, Costantini *et al.* (2017) ont appliqué le schéma de typage « int » à des oenophages induits de souches lysogènes italiennes, et ont observé la présence de 1 à 4 intégrases distinctes par phage présent. Ceci est contraire à notre large étude *in silico* qui confirme bien la présence d'un seul type d'intégrase sur le génome de tous les oenophages analysés.

Enfin, notre analyse montre que les prophages de type A et C sont plus fréquemment associés à des souches du groupe MLST A. La structure de la population chez *O. oeni* en deux groupes majoritaires A et B a été confirmée par Campbell-Sills *et al.* (2015) en utilisant différentes approches : MLST, signature des tétranucléotides, SNP et alignements des génomes complets. Une unique souche (C52) a été affiliée à un troisième groupe C, et représenterait un groupe génétique qui a précédé l'émergence des groupes A et B. La définition de deux sous-espèces (correspondant aux groupes A et B) n'est pas soutenue par les travaux de Campbell-Sills *et al.* (2015) qui observent que les souches du groupe MLST B sont rarement associées au vin. L'émergence du groupe A signerait l'émergence de souches particulièrement adaptées au vin et au cidre, caractérisées par une diversité génétique moindre.

2.2. Apports des nouveaux génomes dans l'évaluation de la diversité des phages A

2.2.1 Un quatrième répresseur – like au sein du groupe A

Nous avons analysé le panel de 29 nouveaux prophages affiliés au groupe A. Ils correspondent pour la majorité a des architectures déjà identifiées par le passé (types A1 à A11). Deux prophages cependant montrent l'absence des gènes codant les protéines hétérologues CI_1, CI_2 et CI_3 et la présence d'un gène nommé cI_4 (100% identité). La protéine déduite a également les caractéristiques classiques des répresseurs phagiques de type CI. Les souches lysogènes pour un prophage porteur du répresseur C_4 sont CRBO 14203 et AWRI 508 et proviennent de vin blanc de Bourgogne et de vin rouge de Grenache, respectivement (Campbell-Sills *et al.*, 2017 ; Sternes & Borneman, 2016) (**Figure 30**).



B

	Répresseur CI
Prophages connus	
Φ0608*	1*
Φawri548/Φ0205/ΦB16	1
Φ0501	2
ΦS161 / ΦS28 / ΦS22	2
Φawri568/ΦL26-1*/ Φawri 429/ Φawri 576	2*
Φawri 422	2
Φ0502*	3*
Φ1491	2
Nouveaux prophages étudiés *in silico*	
ΦCRBO14194 / ΦCRBO14196 / ΦCRBO14198 / Φawri454	2
ΦCRBO 14238/Φawri503/Φawri509/ Φawri984	2
Φawri490	1
Φ14223	2
Φ14203*	4*
Φawri508	4

Figure 30. Identification d'un quatrième type de répresseur CI-like chez les phages A. A, organisation des modules de lysogénie et présence des gènes codant l'intégrase et le répresseur putatif (en rouge) ; B, distribution des 4 gènes CI-like au sein de la collection de prophages. Les prophages sont ceux étudiés par Jaomanjaka (2014) ainsi que 12 des 32 prophages A identifiés dans ce travail.*phage-type représentant chaque protéine CI.

Nous avons cherché à savoir si la présence des gènes CI (1 à 4) sur les prophages est la signature de groupes d'immunité distincts. Nous avons dans un premier temps induit l'excision des prophages des souches IOEB 0608 et CiNe (CI_1), L26.1 (CI_2) et CRBO14203 (CI_4) en présence de MC (1 µg/ml). L'expérience n'a pu être réalisée avec un prophage portant le répresseur CI_3, car l'unique souche lysogène de ce type, nommée IOEB 0502, est non inductible par la MC à la concentration utilisée. Les lysats contenant les particules infectieuses correspondant aux phages Φ0608-MC_{CI1}, ΦCINE-MC_{CI1}, ΦL26.1-MC_{CI2}, et Φ14203-MC_{CI4} ont été utilisés afin de lysogéniser la souche sensible IOEB S277. Nous avons obtenu les 4 souches lysogènes IOEB S277 ($\Phi CINE_{CI1}$), IOEB S277 ($\Phi 0608_{CI1}$), IOEB S277 ($\Phi L26.1_{CI2}$), et IOEB S277 ($\Phi 14203_{CI4}$). La sensibilité de la souche témoin et des 4 dérivés lysogènes aux lysats contenant les phages Φ0608-MC_{CI1}, ΦL26.1-MC_{CI2} (ainsi que ΦS161-MC_{CI2} et Φ1491-MC_{CI2}) et enfin Φ14203-MC_{CI4} a été testée. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau XXIX**.

Tableau XXIX. Les prophages A exprimant les répresseurs-like CI (1, 2 ou 4) font partie de groupes immuns distincts

Lysat phagique		Souches bactériennes (et type de répresseur)			
		IOEB S277 (Φ0608MC)	IOEB S277-ΦCiNE-MC	S277-ΦL26.1MC	S277-Φ14203MC
		CI_1	CI_1	CI_2	CI_4
CI_1	Φ0608MC	R	R	0,84	0,44
CI_2	ΦL26.1MC	0,75	0,71	R	0,67
	ΦS161MC	1,22	2,22	R	1,56
	Φ1491MC	1,08	1,00	R	0,75
CI_4	Φ14203MC	1,33	0,44	0,67	R

Le tableau rassemble les valeurs d'eop. L'immunité ou résistance notée R, se traduit par l'absence de plages de lyse (EOP < 10^{-5}).

La présence d'un prophage dans la souche IOEB S277 bloque l'infection par un phage surinfectant dès lors que ce dernier exprime la même protéine répresseur. Les phages possédant les autres types de répresseur se développent normalement (l'eop est proche de 1). Nous démontrons donc la présence de trois groupes d'immunité distincts au sein des phages, et dont les signatures correspondent aux gènes *cI* (1, 2 et 4). Suite à nos analyses, le schéma de typage s'est donc enrichi d'un 16ème gène et d'un couple d'amorces spécifiques correspondant (**Figure 31**).

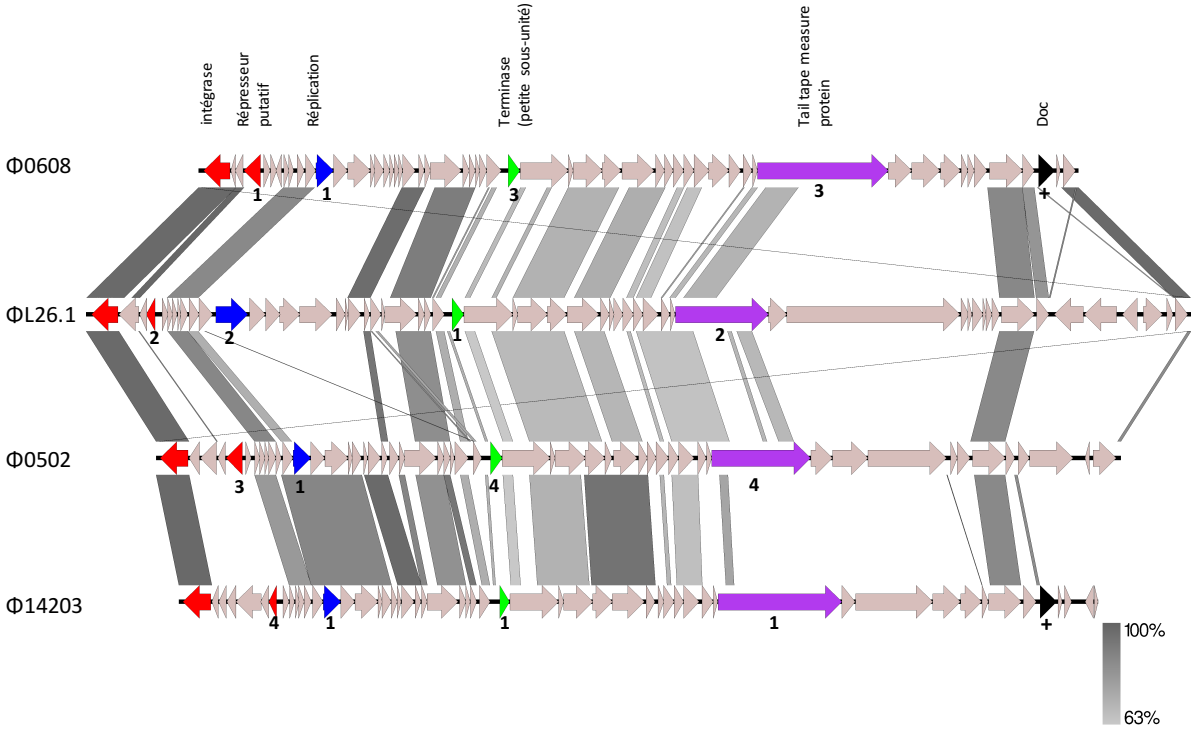


Figure 31. Nouveau schéma de sous-typage des phages A. Les ORFs en couleur correspondent aux gènes ciblés dans cette stratégie de typage. La comparaison nucléotidique des génomes phagiques a été réalisée par Easyfig (Blastn).

Il est intéressant de noter que les 16 gènes retenus pour l'étude sont présents sur cinq prophages : Φ0608, ΦL26.1, Φ1491, Φ0502 et Φ14203. Tous les autres phages A correspondent à des hybrides moléculaires de ces phages.

2.2.2 De nouvelles architectures de prophages A issus de l'analyse du panel supplémentaire de souches

Les 17 nouveaux prophages A identifiés par approche *in silico* ont été analysés dans le schéma de sous typage et trois nouvelles configurations nommées A12, A13 et A14 ont été mises en évidence (**Tableau XXX**). Le type A12 se différencie du type A6 par l'absence du gène *doc* (et peut être de la partie distale du génome). Les sous-types A13 et A14 portent tous deux les gènes codant le quatrième type de répresseur.

Tableau XXX. Diversité des phages et prophages A

	cI	Rep	TerS	TMP	Doc	Sous-type
Prophages connus						
ϕ0608·	1*	1*	3*	3*	+*	A1
ϕ Awri548/ϕ0205/ϕB16	1	1	1	1	+	A2
ϕ0501	2	2	1	1	-	A3
ϕS161*/ϕS28/ϕS22	2	2	2	2	-	A4
ϕ Awri568/ϕL26–1·/ Awri 429/ Awri 576	2*	2*	1*	2*	-	A5
ϕ Awri 422	2	2	2	1	+	A6
ϕ0502·	3*	1	4*	4*	-	A7
ϕ1491·	2	1	2*	1*	-	A8
Nouveaux prophages étudiés *in silico*						
ϕCRBO14194/ϕCRBO 14196/ ϕCRBO14198/ϕAwri454	2	2	1	2	-	A5
ϕCRBO 14238/ϕAwri503/ ϕAwri509/ϕAwri984	2	2	2	1	+	A6
ϕAwri490	1	1	1	1	+	A2
ϕCRBO14223	2	2	2	1	-	A12
ϕCRBO14203·	4*	1	1	1	+	A13
ϕ Awri508	4	2	2	1	-	A14
Phages libres connus (2013)						
OE33PA3 (S161)	1	1	2	2	+	A9
OE33PA6 (S28)	1	1	2	2	-	A10
OE33MC1	2	1	1	2	-	A11

* séquences protéiques modèles utilisées pour la recherche *in silico,* par blastp

2.3. Elargissement du schéma au typage des phages B et C

Jaomanjaka (2014) a montré l'existence de réarrangements génomiques au sein du super-groupe ABC entre les phages A, B et C. Il est donc possible que le schéma de typage rapide mis au point

puisse être fonctionnel pour l'analyse rapide des phages B et C. Nous avons dans un premier temps procédé à des comparaisons génomiques au sein des génomes prophagiques de type B (n=15) et C (n=24) disponibles afin d'écarter les génomes identiques. Les génomes retenus ont ensuite été analysés quant à la présence des 16 gènes du schéma de sous typage.

2.3.1 Nouveaux prophages B et C identifiés

• En début de thèse, peu de séquences de phages B étaient disponibles. Seuls trois prophages ϕ10MC, C23(B) et Awri202(B), ainsi que le phage ex-tempéré OE33PA (Jaomanjaka *et al.*, 2016) avaient été comparés et montraient peu de conservation nucléotidique, en dehors de la séquence du gène codant l'intégrase. Au sein des 15 nouveaux prophages, quelques génomes identiques ont été identifiés. Au total nous avons soumis 39 oenophages à l'analyse.

• Jaomanjaka (2014) avait observé la détection concomitante des prophages C avec un phage A ou D. Par ailleurs, la rareté des prophages de type C avait été soulignée et seules quatre souches [Awri304(C), S28(C), Awri318(C) et S19(C)] sur un ensemble de 50 en possédaient un, tous distincts (sous-types C1, C2, C4 et C5). L'hypothèse que les phages C soient défectifs et nécessitent un phage *helper* avait donc été proposée. Expérimentalement, l'absence de particules phagiques de type C après induction des souches S28 et S19 à la MC avait pu être vérifiée. De façon surprenante, notre étude montre que les prophages C sont particulièrement représentés dans le nouveau panel de souches mises à disposition. Parmi les 21 nouveaux prophages analysés, beaucoup sont identiques et se répartissent dans le groupe C5 et le nouveau groupe C3 (**Figure 32** et **Tableau IV**).

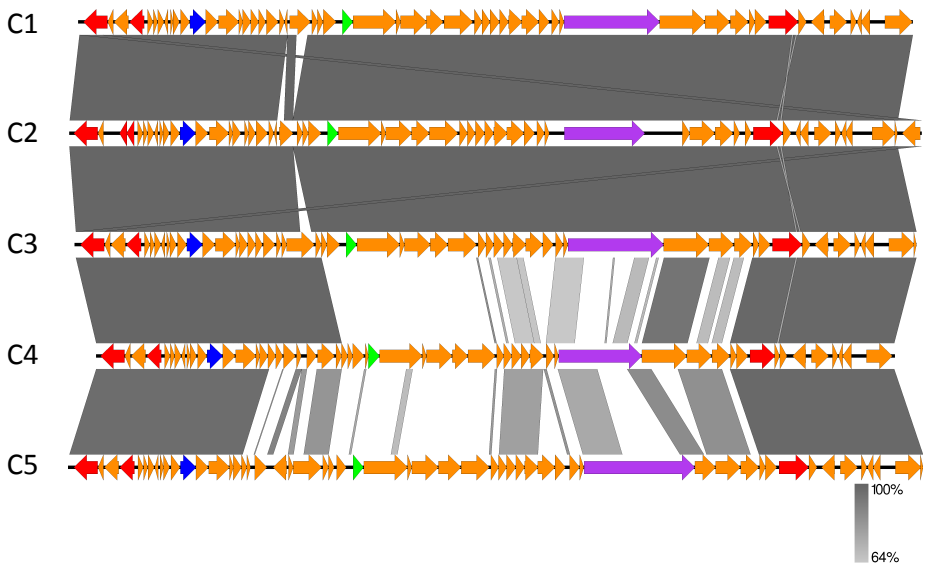


Figure 32. Alignement des 5 sous-groupes de phages int-C. La comparaison par Blastn a été réalisée grâce à Easyfig. Le sous-type C1 est représenté par le prophage ϕS28, C2 par ϕS19, C3 par ϕAwri330, C4 par ϕAwri304 et C5 par ϕAwri318.

La majorité des nouveaux prophages C sont abrités dans des souches australiennes (Borneman *et al.*, 2012; Sternes & Borneman, 2016), isolées à partir de Shiraz (1981), de Chardonnay (1982), ou d'un vin rouge particulier (1992) (**Tableau XXXI**). L'analyse phylogénétique de ces souches révèle qu'elles sont très proches, voire identiques pour certaines (Sternes and Borneman, 2016). Le nombre plus élevé de prophages C dans le panel semble donc un artéfact lié à la redondance des souches australiennes.

Tableau XXXI. Origine des souches porteuses des prophages C

Sous-type	Prophage	Origine	Référence
C1	ϕS28	Vin rouge, France, 2009	Dimopoulou *et al.*, 2014
C2	ϕS19	Vin rouge, France, 2009	Dimopoulou *et al.*, 2014
C3	ϕCRBO14110	Non précisée	El Khoury, 2014
	ϕAwri330	Chardonnay, 1982, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri333	Chardonnay, 1982, Austra ie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri334	Pinot noir, 1982, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri335	Shiraz, 1981, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri141	1980, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕOM22	Vin rouge, 2007, Italie	Capozzi *et al.*, 2014
	ϕAwri888	1985, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri131	Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri342	Shiraz, 1981, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri346	Vin rouge, 1981, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri460	2002, ustralie	Sternes and Borneman, 2016
C4	ϕAwri304	1999, Australie	Borneman *et al.*, 2012
C5	ϕAwri708	Merlot, 2009, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri127	Vin rouge, 1992, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri126	Vin rouge, 1992, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri1116	Vin rouge, 1992, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri318	1956, Australie	Borneman *et al.*, 2012
	ϕAwri316	Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri887	1986, Australie	Sternes and Borneman, 2016
	ϕAwri867	19 6, Australie	Sternes and Borneman, 2016

Les ensembles de prophages identifiés en jaune et en orange proviennent de souches appartenant au même cluster phylogénétique.

Enfin, il est intéressant de noter que les phages C présents dans le nouveau panel de souches sont les uniques prophages présents, et sont classés dans les groupes C3 et C5. Il s'agit de souches australiennes (une souche vient également d'Italie). La souche représentant le groupe C4 vient également d'Australie. Ces prophages « australiens » sont donc différents des prophages associés aux souches « françaises « regroupées dans les groupes C1 et C2. D'autre part, les phages de groupes C1 et C2 sont *a priori* défectifs selon Jaomanjaka (2014). Il serait donc judicieux de tester si la présence de gènes différents au niveau de la partie centrale des génomes des phages de groupe C4 et C5 est corrélée ou non à leur capacité à former des particules infectieuses après induction.

2.3.2. Intégration des phages B et C au schéma de typage : vers un outil applicable aux membres du super-groupe ABC

Les différentes architectures des phages B (12) et C (5) identifiés ont été analysées selon la présence/absence des 16 gènes retenus pour le schéma de typage des phages A.

Répresseur cI. Deux nouvelles protéines CI (nommées CI_5 et CI_6) sont spécifiques des phages B (et sont absentes dans le cluster D et dans les phages A et C). Quelques prophages B portent toutefois un gène codant pour une protéine fortement homologue au répresseur CI_1 (associée jusqu'ici à des prophages A). Sa séquence protéique présente plus de 70% d'identité avec la protéine CI_1 de référence (souche IOEB 0608) et montre une courte délétion de 5 acides aminés sur l'extrémité N-terminale de la protéine (**Figure 33**). Cette protéine tronquée nommée CI_{1del} est également associée à tous les prophages du groupe C portées par les souches australiennes (AWRI). Les amorces dessinées sur le gène cI_1 sont positionnées sur l'extrémité 3' du gène et permettent donc également la détection du gène cI_{del} des prophages C et B. L'immunité conférée par ces gènes *cI*-like sera difficile à vérifier expérimentalement. Nous ne possédons au laboratoire aucun prophage de type B porteur du gène CI_{1del}, et d'autre part aucun phage de type C ne peut être retrouvé seul dans un lysat obtenu après induction MC des souches lysogènes disponibles au laboratoire.

Figure 33. Comparaison des protéines CI_1 et CI_{1del} (clustal omega).

Protéines de Réplication. Les deux gènes *rep*$_1$ et *rep*$_2$ associés aux phages A sont retrouvés au sein des modules de réplication des phages C et B. Les protéines Rep$_2$ et Rep$_1$ signent l'appartenance aux sous clusters B et C, respectivement. La seule exception est la présence de *rep1* dans le génome du prophage non inductible associé à la souche C23 et aux souches CRBO14222, CRBO14209 et CRBO14221 (leur inductibilité n'a pas été testée). Il est possible que la présence de *rep1* dans une organisation génomique de type B ne permette pas au phage d'être induit et/ou de former des particules.

Encapsidation. Les phages B et C montrent la même complexité que les phages A au niveau des gènes codant les petites sous-unités des terminases, et portent indifféremment l'un des trois gènes *terS*$_1$, *terS*$_2$ et *terS*$_3$. Il en est de même pour la TMP, et aucune protéine significativement différente n'a été identifiée chez les phages B et C par rapport à l'inventaire réalisé pour les phages A. Les protéines TMP des phages B et C montrent cependant des homologies plus faibles, ce qui rendra nécessaire le dessin de nouveaux couples d'amorces consensus pour chaque type de TMP. Chez les phages C, une version délétée du gène *tmp*$_4$ (*tmp*$_{4del}$) est très répandue. Le gène *tmp*$_4$ est retrouvé chez un seul prophage de type A, qui a la caractéristique d'être non inductible. La présence de *tmp*$_4$ constitue peut-être un élément génétique caractéristique de cette incapacité à former des particules après induction.

Les nouveaux éléments issus de l'analyse des nouveaux prophages B et C ont été intégrés au schéma de typage des phages A et l'ensemble est présenté dans le **Tableau XXXII**. L'analyse montre que hormis l'intégrase, il n'existe pas d'autre signature des types A, B et C parmi les gènes retenus. Des réarrangements génomiques et échanges de gènes complexes sont visibles, et les groupes nommés et basés sur la présence des intégrases A, B et C ne correspondent vraisemblablement pas à la définition du cluster génétique donnée par Hatfull *et al.* (2010). Il est à noter que la distribution des deux gènes *rep* marque l'appartenance aux groupes B et C. Cependant les phages A contiennent rep$_1$ ou rep$_2$.

L'examen du nombre et de la distribution des TMP est également intéressant et il pointe la présence de 4 protéines (et de variants) chez les oenophages (et majoritairement chez les prophages). La TMP 3 reste rare dans le panel étudié, comme évoqué précédemment. Par ailleurs, la TMP4 est associée à des prophages dont l'aspect défectif a été observé : 0502(A), S28(C) et S19 (C).

Enfin, on note que le recours au gène *doc* est limité dans le cadre d'un sous typage dans le super-groupe ABC, car il n'est associé qu'à des phages de type A.

Tableau XXXII. Sous-typage simplifié des phages du super-groupe ABC.

	Génomes phagiques	CI	Rep	TerS	TMP	Doc	Sous-groupe
A	Prophages						
	ϕ0608*	1	1	3	3	+	A1
	ϕ0205	1	1	1	1	+	A2
	ϕ0501	2	2	1	1	-	A3
	ϕS161	2	2	2	2	-	A4
	ϕL26-1*	2	2	1	2	-	A5
	ϕaw422	2	2	2	1	+	A6
	ϕ0502*	3	1	4	4	-	A7
	ϕ1491*	2	1	2	1	-	A8
	ϕ14223	2	2	2	1	-	A12
	ϕ14203 *	4	1	1	1	+	A13
	ϕaw508	4	2	2	1	-	A14
	Phages libres						
	OE33PA3 (S161)	1	1	2	2	+	A9
	OE33PA6 (S28)	1	1	2	2	-	A10
	OE33MC1	2	1	1	2	-	A11
B	prophages						
	ϕC23/ϕCRBO14222/ ϕCRBO14209/ϕCRBO14221	6	1	1	1	-	B1
	ϕAwri847/ϕAwri438	$C1_{del}$	2	1	2	-	B2
	ϕAwri202	$C1_{del}$	2	1	$TMP1_{del}$	-	B3
	ϕAwri133	6	2	3	$TMP1_{del}$	-	B4
	ϕ10MC	5	2	2	$TMP1_{del}$	-	B5
	ϕAwri124	6	2	3	2 bis	-	B6
	ϕAwri11105	5	2	1	$TMP1_{del}$	-	B7
	ϕAwri128	6	2	3	1	-	B8
	ϕAwri424	$C1_{del}$	2	3	3 bis	-	B9
	ϕCRBO14210	5	2	3	3 bis	-	B10
	ϕAwri150	6	2	1	1	-	B11
	Phages libres						
	OE33PA	5	2	1	1	-	B12
C	prophages						
	ϕS28	$C1_{del}$	1	3	$TMP4_{del}$	-	C1
	ϕS19	$C1_{del}$	1	3	$TMP4_{del}$	-	C2
	ϕAwri330/ϕCRBO14110/ϕAwri333/ ϕAwri334/ϕAwri335/ϕAwri141/ ϕOM22/Awri888/Awri131/ Awri342/Awri346/Awri460	$C1_{del}$	1	3	$TMP4_{del}$	-	C3
	ϕAwri304	$C1_{del}$	1	2	2	-	C4
	ϕAwri127/ϕAwri318/ϕAwri126/ ϕAwri1116/ϕAwri316/ϕAwri887/ ϕAwri867/ϕAwri708	$C1_{del}$	1	1	1	-	C5

Les protéines « del » présentent une délétion par rapport aux protéines de référence utilisées pour la recherche par Blastp.
Celles notées « bis » présentent entre 70 et 95% d'identité avec les séquences de référence.
*séquences protéiques utilisées dans la recherche Blastp

3. Schéma de sous typage au sein du cluster D

Jaomanjaka (2014) a montré que les phages de type D constituent un cluster homogène distinct du cluster ABC. Ainsi l'identité nucléotidique entre le génome du prophage 9805 et les autres phages D varie de 94 à 98,3%. Les valeurs ANI sont inférieures à 83% avec les phages du cluster ABC, et se limitent à des portions courtes au sein des génomes analysés.

Ceci est confirmé par la recherche des différents gènes précédemment retenus dans le schéma de typage des phages du sous-groupe ABC. Aucun n'est retrouvé chez les 18 phages D analysés. A la place, des protéines numérotées CI_7, Rep_3, $TersS_5$ et TMP_5 sont présentes (**Tableau XXXIII**). L'ensemble des données est homogène dans le cluster et seul le prophage de la souche Awri418 contient un module de réplication différent, dont la signature est la protéine Rep_4.

Tableau XXXIII. Deux combinaisons des gènes choisis sont retrouvées chez les phages D.

	cI	Rep	TerS	TMP	Doc	Sous-groupe D
IOEB 9805	7	3	5	5	-	D1
Awri418	7	4	5	5	-	D2

Pour permettre le sous-typage, nous avons utilisé une autre approche, proposée par Jaomanjaka (2014). Quatre régions de variabilité ont été identifiées entre les prophages D. Différents couples d'amorces PCR spécifiques ont été dessinés sur les zones d'intérêt (Z1 à Z4), permettant de distinguer 5 sous-types (**Figure 34**). La zone 1 correspond au module de réplication.

Nous avons appliqué ce schéma de typage aux 10 prophages D supplémentaires disponibles dans cette étude (**Tableau XXXIV**). Aucune variabilité n'est trouvée au sein du module distal (Z4). Son utilisation n'est donc pas pertinente pour sous-typer les phages D. Cependant différentes combinaisons ont été retrouvées notamment sur la région variable Z3. Au total, nous obtenons 9 sous-groupes de prophages D sur la base de ce schéma de typage.

Les phages D ont une synténie conservée et la variabilité des séquences dans le cluster reste faible par rapport à celle observée dans le cluster ABC. Selon les recommandations de l'ICTV, deux phages appartiennent à la même si leurs génomes partagent une valeur d'ANI > 95% sur une portion de plus de 80% de la longueur des génomes (Adriaenssens and Brister, 2017). Il y aurait donc deux espèces au sein du cluster D, l'une étant représentée par un seul prophage porté par la souche AWRIB880.

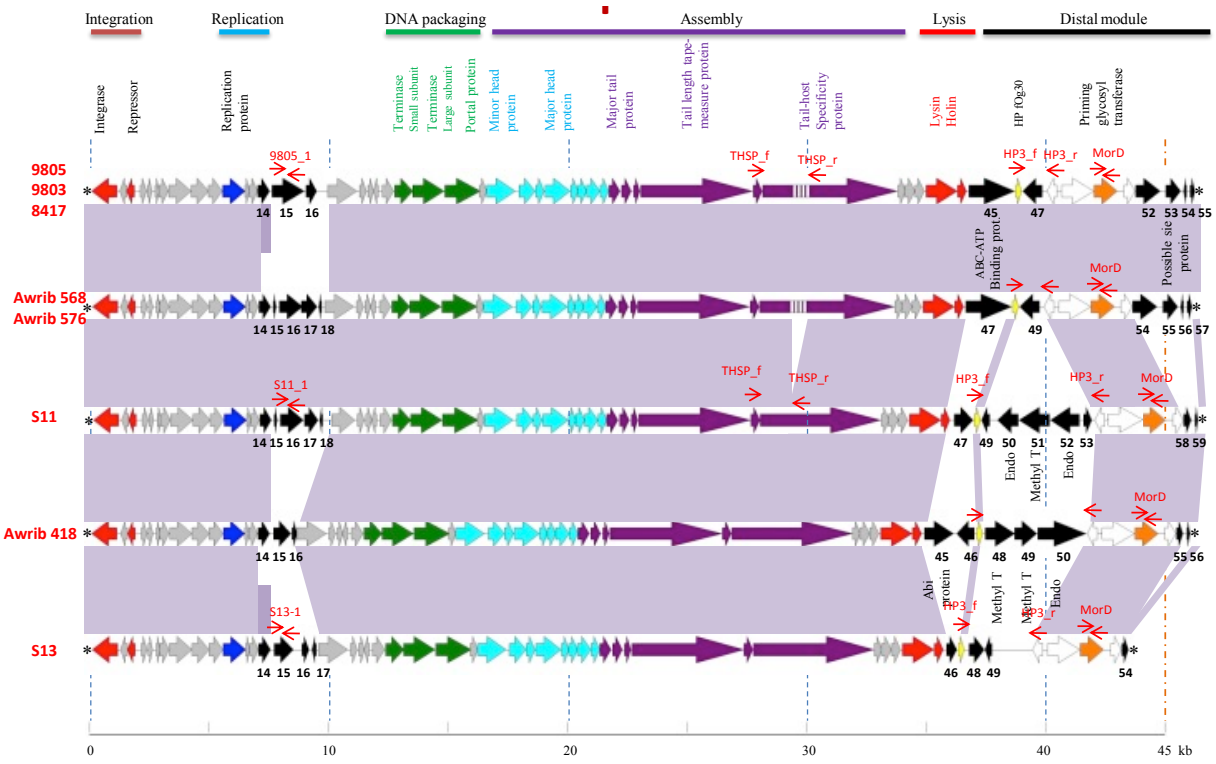


Figure 34. Schéma de typage des phages D selon Jaomanjaka (2014). Les amorces PCR dessinées en rouge ciblent 4 régions variables des génomes. Pour analyser la première région (module de réplication), trois couples d'amorces ont été définis (orf15 9805, orf15S13 et orf16S11). D'autres amorces consensus permettent d'amplifier des fragments de tailles différentes sur le gène de THSP (Z2) et dans le module distal (Z3 et Z4).

Tableau XXXIV. Analyse *in silico* de l'ensemble des prophages du cluster D

Souches	Z1			Z2		Z3						Z4
	Orf15 9805	Orf15 S13	Orf16 S11	Tail host protein		HP3						Moron
	159 pb	160 pb	177 pb	1228 pb	634 pb	1445 pb	1542 pb*	3214 pb	4076 pb*	4699 pb*	5107 pb	545
IOEB 9805/IOEB 9803/ IOEB 8417	x			x		x						x
Awri568/Awri576/Awri583/ Awri503/Awri858/Awri984			x	x		x						x
S11			x		x						x	x
Awri418/Awri816			x		x					x		x
S13		x			x			x				x
Awri683			x		x				x			x
Awri706		x		x							x	x
Awri880/Awri1062		x			x		x					x
Awri548			x		x					x		x

*Nouvelles longueurs d'amplicon détectées *in silico*

Partie II. Application des outils au typage rapide des phages du super-groupe ABC, et du cluster D issus du Millésime 2014

1. Sous-typage des phages du super-groupe ABC isolés au cours du millésime 2014

1.1. Phages A

Sur le millésime 2014, nous avons isolé 30 phages libres porteurs d'un gène codant une intégrase de type A. Ils ont été sous-typés avec succès grâce à l'approche PCR décrite dans la première partie de ce chapitre. Nos résultats sont rassemblés dans les **Tableaux XXXV** et **XXXVI**.

Tableau XXXV. Sous-typage des phages A isolés du millésime 2014

Phages isolés	cI	Rep	TerS	TMP	Doc	Sous-groupe A
A125.2a	1	1	3	3	+	A1
A135.2	1	1	3	3	+	A1
A148.2a	1	1	3	3	+	A1
A151.2	1	1	3	3	+	A1
A152.1	1	1	3	3	+	A1
A154.1a	1	1	3	3	+	A1
A155.2a	1	1	3	3	+	A1
A156.2	1	1	3	3	+	A1
A157.1.	1	1	3	3	+	A1
A160.1b	1	1	3	3	+	A1
A131.1a	1	1	3	3	+	A1
A131.2b	1	1	3	3	+	A1
A130.1	1	1	3	3	+	A1
A128.1	1	1	3	3	+	A1
A129.1	1	1	3	3	+	A1
A153.1a	2	2	2	2	-	A4
A163.1	2	2	1	2	-	A5
A125.2d	1	1	2	2	-	A10
A153.1b	1	1	2	2	-	A10
A166.2	2	1	1	2	-	A11
A125.1	1	1	2	1	-	A15
A143.2	1	1	2	1	-	A15
A131.2a	1	1	2	1	-	A15
A125.2c	1	2	2	2	-	A16
A148.2b	1	2	2	2	-	A16
A151.1b	1	2	2	2	-	A16
A154.1b	1	2	2	2	-	A16
A155.2b	1	2	2	2	-	A16
A160.1a	1	2	2	2	-	A16
A127.1	1	2	2	2	-	A16
A125.2b	1	2	1	1	-	A17

• Notre analyse permet de mettre en évidence **l'existence de trois combinaisons originales supplémentaires, nommées A15, A16 et A17 (Tableau XXXV et XXXVI). Il existe donc au moins 17 sous-types de phages A.** Les phages portant les combinaisons A15, A16 et A17 n'ont pas été identifiés à l'état de prophages dans les 203 souches dont le génome est aujourd'hui disponible (et qui correspondent en grande majorité à des souches isolées de FML jugées performantes). Leur rareté dans les génomes pourrait suggérer qu'ils sont peu adaptés aux fermentations ou bien que les souches hôtes qui les abritent ne survivent pas à la FML. Nous observons que les phages A associés à l'échantillon de moût n°125 correspondent aux trois nouveaux types. Cependant, notre hypothèse n'est pas confirmée par l'examen des 8 autres échantillons contenant des phages de type A15, A16 à A17, qui sont des prélèvements effectués en FA et en FML (**Tableau XXXVI**). Des représentants de ces combinaisons A15, A16 et A17 ont été sélectionnés en vue du séquençage (en cours).

Tableau XXXVI. Sous-types de phages A représentés dans les échantillons du millésime 2014

Echantillon	Origine	Sous-types isolés
125	CF, moût	A1, A10, A15, A16, A17
128	CS/M, Elevage	A1
129	CS/M, Elevage	A1
130	CS/M, FA	A1
131	CS, FA	A15
135	M, FML	A1
143	CS, FML	A15
148	G, FML	A1, A16
151	M/CS, FML	A1, A16
152	M/CS, FML	A1
153	M/CS, FML	A4, A10
154	M/CS, FML	A1, A16
155	M/CS, FML	A1, A16
156	M/CS, FML	A1
157	M/CS, FML	A1
160	M/CS, FML	A1, A16
163	C, FML *	A5
166	M, moût *	A11

• Nous avons utilisé les résultats du typage pour créer un arbre phylogénétique par la méthode UPGMA (**Figure 35**). Le sous-type A7 est original et est représenté par la seule souche non inductible de notre panel, IOEB 0502 isolée de vin rouge. Les gènes originaux présents chez ce prophage (dont la TMP 4) sont peut-être une signature de cette caractéristique. Les sous-types A2 et A10 (en orange) et A6, A9 et A11 (en bleu) correspondent à des prophages et nous n'avons trouvé aucun phage libre correspondant dans notre inventaire sur le millésime 2014. Les phages libres présents dans le milieu sont trouvés dans les groupes représentés en vert et en gris, ainsi que dans les types A8 et A15. Les sous-types identifiés comme prophages ont en commun la TMP n°1, alors que les phages libres isolés de l'environnement présentent généralement la TMP 2 ou 3.

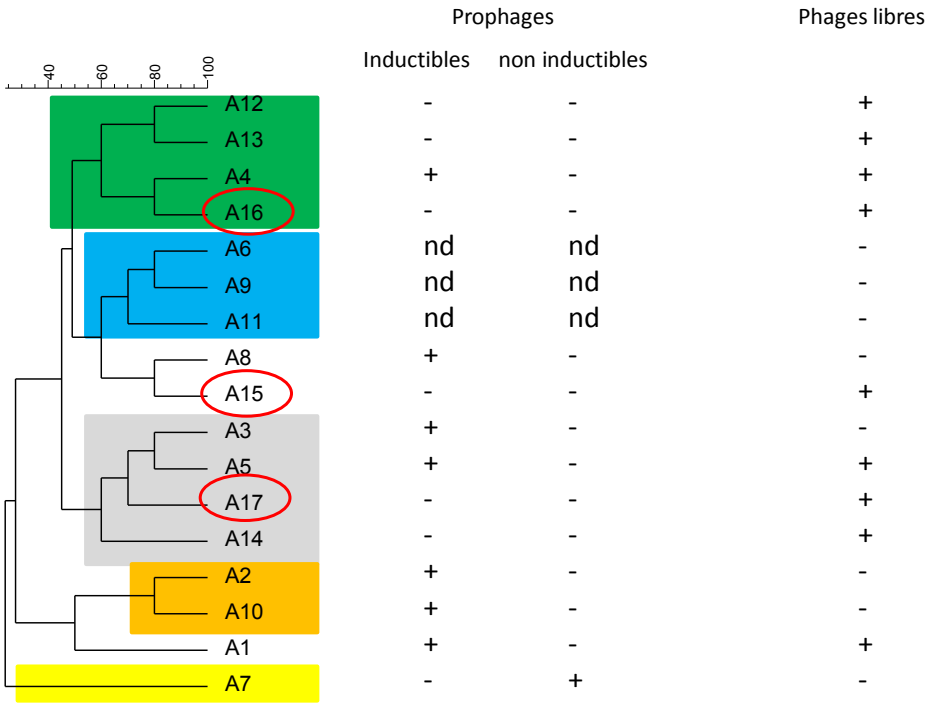


Figure 35. Arbre phylogénétique des phages A (méthode UPGMA) et comparaisons avec le caractère lytique. nd : non vérifié (souche non disponible au laboratoire).

• Le sous typage des phages A montre de nouveau **la richesse des échantillons car 7 contiennent au moins deux types de phages A.** Par ailleurs, il montre un contenu identique en espèces phagiques pour des échantillons susceptibles de provenir de mêmes origines : 151, 154, 155 et 160.

• Au total, **huit des 17 types de phages A sont représentés dans le millésime 2014.** La moitié des phages de type A appartiennent au sous-type A1 (n=15). Ce sous-type n'avait pas été retrouvé parmi les phages isolés en 2013 à partir de vins rouges, et n'était représenté jusqu'à présent que par le prophage de la souche IOEB 0608 (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Plusieurs phages appartiennent également au nouveau sous-type A16 (n=7). Ces résultats peuvent cependant avoir été influencés par l'échantillonnage du millésime 2014 (l'origine commune des échantillons contenant le type A16 étant possible). En 2013, la majorité des phages A isolés étaient de sous-type A4 (n=7), et un phage présentait la combinaison A5. Ces sous-types sont également retrouvés en 2014. De plus, certaines combinaisons originales identifiées lors de l'isolement 2013, en particulier A12 et A14, sont également retrouvées dans notre étude de 2014.

• Enfin, comme évoqué pour les types A15, A16 et A17, aucune corrélation n'est faite entre les sous-types présents et le stade : moût, FA ou FML (**Tableau XXXVI**). L'analyse devra à présent être étendue aux phages issus du millésime 2015.

1.2. Phages C isolés au cours du millésime 2014

Un phage C a été isolé conjointement avec un phage B sur le millésime 2014 à partir de l'échantillon de vin rouge n°149 (protocole 2). L'isolement du phage type C (nommé C149) a été finalement obtenu en poursuivant les repiquages. Une plage répondant uniquement à la PCR spécifique de l'intégrase C a été purifiée et un lysat préparé. Le typage du phage a montré qu'il appartient au groupe C3. Jusqu'à présent les phages C3 étaient associés à des souches australiennes. Etant donné que nous ne disposions pas au laboratoire de souches lysogènes pour un phage C3, et que ce dernier semblait infectieux (alors que nous suspectons les phages C d'être défectifs), nous avons entrepris son séquençage.

La séquence du phage C149 partage 100% d'identité nucléotidique avec les génomes des prophages de type C3. Les données de séquençage à l'étape de l'assemblage ont toutefois montré la présence d'un second ADN phagique contaminant (ratio 50/50), nommé X149.2. Notre protocole de purification des phages implique l'enchaînement de 3 repiquages successifs de plages isolées, et un phénomène de contamination révélé à l'étape du séquençage ne s'était jamais produit auparavant. Le phage X149.2 a été purifié avec succès par repiquages successifs, puis à nouveau séquencé. Le phage X149.2 forme des plages claires et de grande taille sur son hôte IOEB S277. Son isolement confirme donc la difficulté d'isolement des phages C seuls, et semble compatible avec leur impossibilité à se répliquer seuls dans le vin. Il permet par ailleurs d'identifier un nouveau type de phage, ne contenant pas les séquences signatures des oenophages ABCD et présentant un potentiel lytique dans le vin.

Le séquençage du phage X149.2 a montré un génome de taille 42,7 kb. L'annotation confirme l'absence de module de lysogénie et X149.2 est donc un phage lytique « professionnel » (Hobbs and Abedon, 2016).

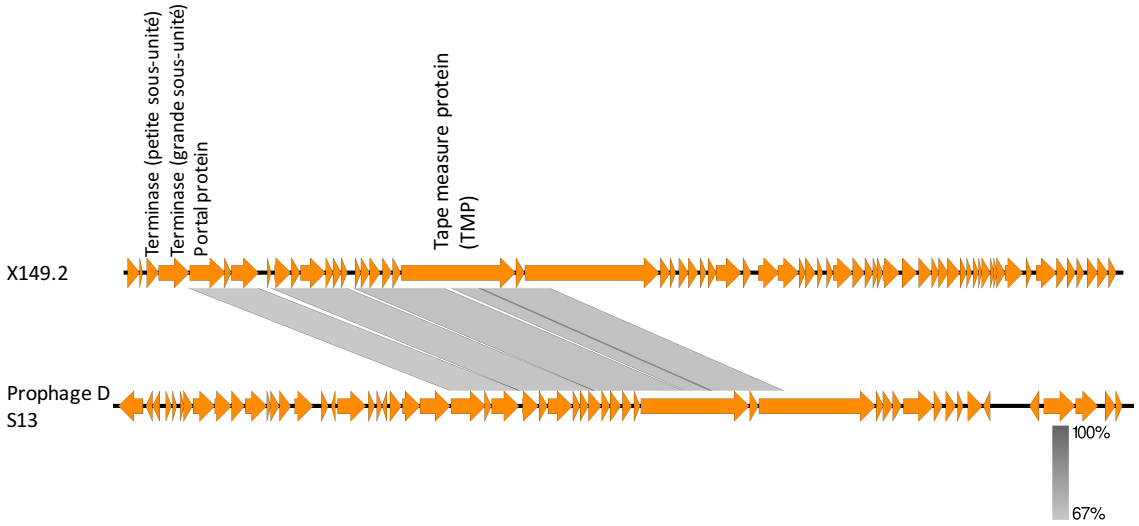


Figure 36. Comparaison du phage X149.2 avec le prophage S13 du cluster D (Blastn par Easyfig).

X149.2 partage de très courtes régions d'homologie avec quelques phages A (92%) et B (86% avec le génome de B10). Une région conservée de taille plus importante est identifiée chez les prophages du cluster D comme S13 (D) et couvre environ 30% de la longueur des génomes. L'identité nucléotidique de la région est de 70% et elle correspond aux gènes associés aux fonctions d'empaquetage (**Figure 36),** et notamment le gène *tmp*$_5$**.** Tous ces éléments nous permettent de proposer que X149.2 est le représentant d'un nouveau cluster de phages lytiques.

L'analyse de X149.2 nous a également révélé que l'endolysine a une séquence originale par rapport à celles des phages affiliés aux phages ABC et D. La protéine de 358 aa est une muramidase et montre de fortes identités avec les lysines de Lactobacilles, dont *Lb. ultunensis* (87% d'identité ; e-value 5 e^{-121}). Nous avons dessiné des amorces PCR *lys*$_{X149}$ afin de disposer d'un outil de détection spécifique, et appliqué la PCR aux phages non typés (c'est-à-dire « non ABCD ») du millésime 2014. Aucun signal n'a été visualisé. Ces phages ont été précédemment analysés par RAPD montrant l'existence d'un groupe homogène, nommé unk. L'absence de signal PCR des phages *unk* en présence des amorces dessinées sur l'endolysine de X149.2 suggère qu'ils sont distincts du phage X149.2. Nous avons également analysé les 7 phages « non ABCD » issus du millésime 2015 à l'aide de la PCR *lys*$_{X149}$. Cinq n'ont pas donné de signal. Leur appartenance au type/cluster unk (ou à un autre) devra être précisée ultérieurement. Deux phages ont montré une amplification et ils ont été nommés X27.1 et X28.2. Les phages X149.2, X27.1 et X 28.2 ont tous trois été isolés de vinifications en rouge (Merlot) en FML, en FA et dans le moût, respectivement. Les génomes des phages X27.1 et X28.2 présentent 100% d'identité nucléotidique. Leur séquence et architecture sont très proches de celles de X149.2. Les phages X28.2 et X149.2 partagent une identité nucléotidique de 95,4% et représentent donc une espèce d'oenophages. Un alignement est proposé dans la **Figure 37,** et met en évidence les zones hétérologues situées dans les gènes de réplication, de la terminase, et d'une partie du gène de l'endolysine.

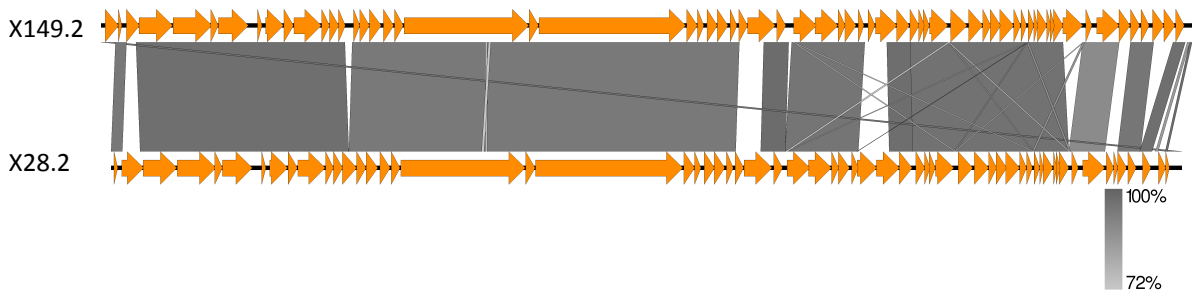


Figure 37. Comparaison nucléotidique des phages lytiques X149.2 et X28.2 (Easyfig).

1.3. Phages B isolés au cours du millésime 2014

Les génomes des phages B148 et 149 ont été typés et correspondent au sous type B12, représenté par le phage OE33PA isolé de vin (Jaomanjaka *et al.*, 2016). Ces deux phages ont été isolés de 2 échantillons en échec de FML provenant de la même propriété, mais de cépages différents. Tout comme le phage OE33PA, ils produisent des plages claires. Nous avons donc procédé au séquençage des trois phages afin de comprendre le(s) mécanisme(s) expliquant la perte de la capacité des phages à lysogéniser leur hôte. Les phages B148 et B149 se sont révélés identiques, et sont très proches du phage OE33PA (99,9% d'identité sur 96% de couverture). Une variation est présente dans le module de réplication (**Figure 38**). Ces phages représentent une seule espèce phagique. L'analyse de leur génome montre qu'il existe une délétion du site *att*P cœur (São-José *et al.*, 2004). Ces trois phages libres proviennent donc d'évènements d'excision erronée.

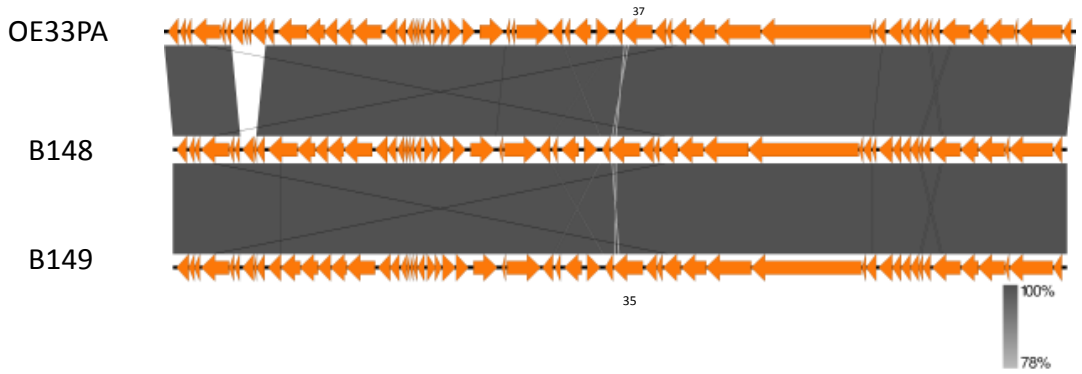


Figure 38. Comparaison nucléotidique des trois phages B libres (Easyfig)

2. Phages du cluster D isolés au cours du millésime 2014

Les 5 phages D isolés du vin ont été sous-typés selon l'approche développée précédemment (**Tableau XXXVII)**.

Tableau XXXVII. Sous-typage des phages D isolés.

Souches	Z1			Z2		Z3						Z4
	Orf15 9805	Orf15 S13	Orf16 S11	Tail host protein		HP3						Moron
	159 pb	160 pb	177 pb	1228 pb	634 pb	1445 pb	1542 pb*	3214 pb	4076 pb*	4699 pb*	5107 pb	545
D164.1 (ou OE33SAG)		x			x			x				
D2.2a		x			x						x	x
D2.2b		x			x						x	x
D157.1	x			x		x						x
D127.1	x			x		x						x

Le phage D164.1 (également nommé OE33SAG dans notre étude) est du même sous-type que le prophage de la souche S13, mais ne présente pas d'amplification pour la PCR ciblant un gène de moron.

Les phages D2.2a et D2.2b se sont révélés identiques, et montrent une taille d'amplifiat d'environ 2500 pb lorsque la PCR ciblant la zone Z3 est appliquée. Afin d'évaluer l'originalité potentielle de cette région, le phage D2.2a sera séquencé prochainement.

Les phages D157.1 et D127.1, quant à eux, sont du même type que le prophage de la souche IOEB 9508. Ce prophage s'est révélé inductible à la MC (1 µg/ml) mais le titre d'induction obtenu n'excède pas 10^3UFP/ml, et le phage forme de petites plages troubles sur la souche sensible IOEB S277. Il est donc fort probable que nous ayons isolé ce même phage à partir d'échantillons de vin.

Partie III. Caractérisation des phages unk

Plusieurs phages isolés lors du millésime 2014 ne possèdent pas les séquences signatures des gènes codant les intégrases associées aux clusters ABC et D. D'autre part, un premier examen rapide a été réalisé par RAPD-PCR et tous les phages analysés ont montré des profils similaires. Le groupe a été nommé unk. Dans cette partie, les phages unk162.1 et unk67.1 isolés à partir de moût de raisin blanc ont été retenus comme représentants du groupe et caractérisés.

1. Morphologie

Les lysats des phages unk162.1 et unk67.1 ont été concentrés en vue de l'observation des particules en MET (**Figure 39**). Ils présentent les caractéristiques des *Siphoviridae,* avec une longue queue (~ 300 nm), non contractile, comme l'ensemble des oenophages décrits à ce jour (Davis *et al.*, 1985 ; Nel *et al.*, 1987 ; Henick-Kling *et al.*, 1986b ; Arendt *et al.*, 1991 ; Boizet *et al.*, 1992 ; Arendt and Hammes, 1992 ; Santos *et al.*, 1996 ; Poblet-Icart *et al.*, 1998 ; Jaomanjaka *et al.*, 2016 ; Costantini *et al.*, 2017).

A B

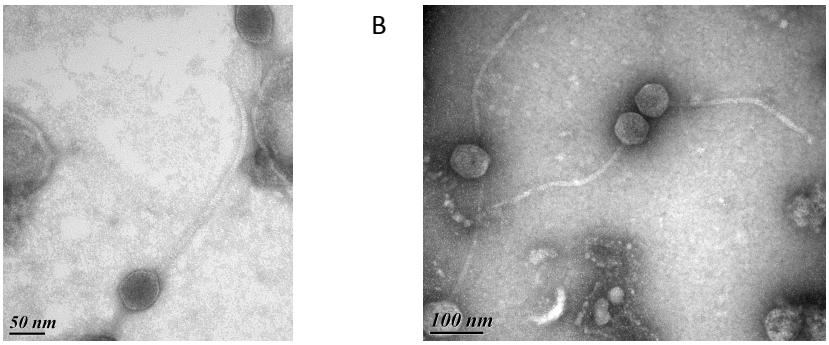


Figure 39. Observation des phages unk162.1 (A) et unk67.1 (B) en MET

2. Spectre d'hôte

Le spectre de résistance du phage unk162.1 a été réalisé sur 24 souches d'*O. oeni* (**Tableau XXXVIII**). Le phage infecte 11 souches dont quelques levains commerciaux. Les souches sensibles au phage sont en large majorité (10/11) du groupe MLST A. C'est également ce qui avait été observé pour 17

autres phages (Jaomanjaka, 2014) dont OE33PA (Jaomanjaka *et al.*, 2016) testés sur 34 souches d'*O. oeni*. Notre étude montre cependant pour la première fois la sensibilité d'une souche du groupe MLST B (S12) à un oenophage. Nous avons vérifié que S12 est résistante au phage OE33PA (cluster B). Le spectre du phage unk sera réalisé prochainement sur un plus grand nombre de souches des groupes MLST A et B et ces données seront comparées avec celles obtenues avec des phages ABC, D et X. Ceci pourra être complété par des études plus détaillées de la biologie des phages. Chez d'autres groupes bactériens, les regroupements de génomes (en fonction de différences d'ANI par exemple) « capturent » des différences d'adaptation des phages à leur environnement (spectre, cinétiques d'adsorption, burst size, cyle lytique ou lysogénique … (Duhaime *et al.*, 2017).

Tableau XXXVIII. Spectre d'hôte du phage unk162.1 sur 24 souches d'*O. oeni*

Souche	Origine	Type MLST	Lysogénie	EOP
IOEB C52	Cidre, Normandie France	C	A	$<10^{-8}$
Sarco S12	Vin blanc, France	B	non	10^{-6}
Sarco S13	Vin rouge, France	B	D	$<10^{-8}$
IOEB C23	Cidre, Normandie France	B	B	$<10^{-8}$
IOEB C28	Cidre, Bretagne France	B	D	$<10^{-8}$
IOEB 9803	Vin rouge, France	B	D	$<10^{-8}$
IOEB 9805	Vin rouge, France	B	D	$<10^{-8}$
AWRI B429[a]	Lalvin VP41 Lallemand	A	A and D	1
IOEB 0608	France	A	A	10^{-5}
Sarco S11	Vin blanc pétillant, France	A	D	$<10^{-8}$
IOEB CiNe[a]	Levain CHR Hansen	A	A and C	1
Sarco 28[a]	B28 PreAc, Laffort, France	A	A and C	$<10^{-8}$
IOEB 9517	Floc de Gascogne, France	A	Non	10^{-4}
IOEB Sarco 450[a]	450 PreAc Laffort, France	A	Non	$<10^{-8}$
IOEB 1491	Vin rouge, France	A	A	10^{-1}
Sarco S19		A	A and C	1
IOEB B10	France	A	B	1
IOEB Sarco 277[a]	SB3 Laffort, France	A	non	1
Sarco S15	Vin rouge, France	A	non	1
Sarco S161[a]	350 PreAc Laffort, France	A	A	1
Sarco S25	Vin rouge	A	non	$<10^{-8}$
IOEB L26.1	Liban	A	A	1
Sarco 26	Vin rouge, France	nd	nd	1
Sarco 51	Vin rouge, France	nd	nd	$<10^{-8}$

[a] levains commerciaux.

Les eop mesurées sur les 11 souches sensibles sont variables et les souches IOEB 0608, IOEB 9517 et S12 montrent un phénomène de résistance par rapport au phage unk162.1. La présence d'un système RM actif contre le phage OE33PA a été démontrée chez la souche IOEB 0608 (Jaomanjaka, 2014). Nous avons également montré que le système est efficace contre le phage unk162.1 (**Tableau XXXIX**). La souche IOEB 9517 exerce une résistance de niveau comparable, mais le phénomène semble lié à deux mécanismes distincts.

Tableau XXXIX. Mise en évidence de l'efficacité du système RM de la souche IOEB 0608 vis-à-vis du phage unk162.1.

Souche	Unk162.1(277)	Unk162.1(277)(0608)	Unk162.1(277)(9517)
IOEB S277	1,00E+00	7,61E-01	1,81E+00
IOEB 0608	9,84E-04	1,00E+00	5,40E-03
IOEB 9517	7,76E-04	6,10E-02	1,00E+00

Les eop sont représentées. Moyennes de trois réplicats.

Nous avons également réalisé un spectre de résistance sur de nombreuses souches de BL d'espèces et d'origines différentes (**Tableau XL**). Le phage unk162.1 s'est révélé incapable d'infecter les souches testées. Dans les études ultérieures, il serait intéressant d'isoler d'autres BL du vin afin d'étendre le panel de souches testées dans ce spectre de résistance.

Tableau XL. Spectre d'hôte du phage unk162.1 sur des souches de différentes espèces de BL.

Espèce	**Souche**	**Origine**	**EOP**
O. kitaharae	NRIC_0647, NRC_0649, NRIC_0650	Résidus de Shochu, Japon	$<10^{-8}$
O. alcoholitolerans	JP736, M7212	Production de bioéthanol (Collection Marcos de Morais, UFP, BR)	$<10^{-8}$
Lactobacillus plantarum	AL2, AL210, ERS1.11, lp80	CRBOeno	$<10^{-8}$
Pediococcus pentosaceus	ICP01, NRRC, ATCC3316	CRBOeno	$<10^{-8}$
L. crispatus	112.59A, 107.7B, 100.16A,	Patientes atteintes de vaginose (Afrique du Sud) (Collection Rémy Froissart, CNRS Montpellier)	$<10^{-8}$
L. gasseri	107.7A, 114.1A, 117.75A		$<10^{-8}$
L. jensenii	37.31B, 113.22A		$<10^{-8}$
L. rhamnosus	A23, 51A, 57A1, 46A, 52B, 24A, 35A, A22, A21, RZD2, 27C, 21B, 25A,	Cavité bucale (Collection Johan Samot)	$<10^{-8}$
L. plantarum	BMS2		$<10^{-8}$
L. fermentum	BAP3		$<10^{-8}$

3. Le génome de unk162.1

Le génome du phage unk162.1 a une taille de 35,3 kb, et possède un taux de GC de 35,5%. Une valeur de 36,1 à 39,5 % est observée chez les autres oenophages et elle est de 38% chez leur hôte *O. oeni* (souche PSU-1, Mills *et al.*, 2005). On note que les génomes des phages lytiques unk ont une taille plutôt faible par rapport à l'ensemble des oenophages connus (**Tableau XLI**).

Tableau XLI. Comparaison des caractéristiques des génomes des oenophages

Sous-groupe/cluster	ABC	D	X	Unk
Taille du génome (kb)	34,5-40,9	37,2-44	41,8-42,7	35,3-36,3
% GC	36,1-37,4	38,6-39,5	36,6-36,8	35,3-35,5
Cos /pac	cos	pac	pac	pac

Aucun mécanisme *cos* n'a été identifié sur le génome de unk162.1 *in vivo* et *in silico* (en utilisant l'approche bio-informatique « PhageTerm » décrite par Garneau *et al.* (2017). Les approches montrent que les phages ABC sont les seuls à contenir des extrémités cohésives.

Le génome du phage unk162.1 contient 51 ORFs (**Figure 40**), et l'organisation est typique des oenophages ABC et D. Aucun module de lysogénie n'est présent, ce qui fait de l'unk162.1 un phage professionnellement lytique, selon la terminologie proposée par Hobbs et Abedon (2016).

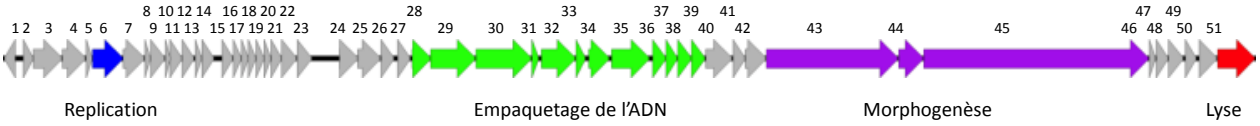


Figure 40. Organisation du génome du phage unk162.1.

L'analyse par Blastp montre que 13 protéines n'ont aucun homologue dans les banques de données. Ces protéines orphelines sont codées au niveau d'une même région du génome (Gp15 à Gp22) associée à la réplication. Neuf protéines ont un homologue chez un prophage d'*O. oeni* appartenant aux clusters ABC ou D. Les 29 protéines restantes montrent des BBH hors espèce. De nombreux homologues sont des composants de phages infectant des entérocoques, des streptocoques, des lactobacilles ainsi que *Weisella sp.* (**Tableau XLII**). C'est le cas de Gp6 (replisome organizer), des sous unités de la terminase ainsi que de la TMP. L'analyse suggère donc que le phage *unk* correspond à un hybride constitué de modules associés à des phages infectant d'autres BL présentes dans l'environnement œnologique en début de fermentation. Le phénomène vient d'être décrit chez les phages des BL laitières *S. thermophilus* et *Lc. lactis* (Szymczak *et al.*, 2017). Les auteurs proposent que des échanges génétiques se sont produits soit pendant l'infection simultanée d'un hôte, ou bien par infection d'une souche contenant un prophage.

Tableau XLII. Génome du phage unk162.1

ORF	Putative function	Strand	Length (AA)	Features	Percent identity	e-value	Source	GenBank accession number
1	DNA nuclease	-	108	VRR-NUC domain-containing protein HP	46 (50/108) 48 (52/108)	5e-23 3e-22	*Lb. plantarum* Phage phiJB_00025, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	WP_069302375.1 YP_008772038
2	HP	+	97	-	-	-	-	-
3	Phage protein	+	280	DUF1351 domain-containing protein	33 (98/299)	2e-38 1e-33	*O.oeni* IOEBC23 Phage vB_EfaS_IME197, *Enterococcus faecalis*	WP_032825883 YP_009188811.1
4	Topoisomerase	+	229	DUF1071 domain-containing protein DUF1071 domain-containing protein	45 (103/230) 45 (90/202)	6e-59 1e-49	*Enterococcus faecium* Lytic phage CB14 (936-group), *Lc. lactis*	WP_086324935 YP_003127172
5	HP	+	60	-	-	-	-	-
6	Replisome organizer	+	298	Prephenate dehydrogenase Putative primosome component	46 (124/267) 45 (130/292)	1e-69 6e-68	*Streptococcus equinus* Lytic phage ΦLYGO9, *Streptococcus agalactiae*	WP_074559889 AFQ95972.1
7	HP	+	210	HP	59 (124/211	1e-76	*O. oeni* AWRIB422	EJO07138.1

ORF	Putative function	Strand	Length (AA)	Features	Percent identity	e-value	Source	GenBank accession number
				HP	30 (83/276)	1e-17	*Lactobacillus acidipiscis*	
8	HP	+	55	-	-	-	-	-
9	Phage protein	+	142	YopX-like protein	74 (101/137) 43 (73/142)	2e-61 9e-07	*O. oeni* IOEB_0501 Phage ΦAT3, *Lactobacillus casei*	X279_05180 YP_025071
10	HP	+	49	-	-	-	-	-
11	HP	+	119	-	38 (27/72)	4e-10	*O. oeni* IOEB_C52	KGI00282
12	HP	+	117	-	29 (33/112)	7e-06	*O. oeni*	OIL58320
13	HP	+	64	-	-	-	-	-
14	Phage protein	+	118	DUF968 domain-containing protein	38 (33/88) 36 (24/67)	2e-05 8e-05	*Leptotrichia sp* Phage ΦStB12, *Staphylococcus hominis*	WP_083378248 AFD22229.1
15	HP	+	106	-	-	-	-	-
16	HP	+	79	-	-	-	-	-
17	HP	+	68	-	-	-	-	-
18	HP	+	73	-	55 (40/73)	5e-18	*O. oeni*	KMQ39592.1
19	HP	+	79	-	-	-	-	-
20	HP	+	67	-	-	-	-	-
21	HP	+	104	-	-	-	-	-
22	HP	+	148	-	-	-	-	-
23	HP	+	146	-	30 (41/136)	8e-04	*Lactobacillus nantensis*	WP_057892403
24	Chromosome segregation protein	+	203	ParB-like nuclease domain	47 (82/176) 46(69/172)	1e-37 3e-36	*Lactobacillus helveticus* Phage (P335-group), *Lactococcus lactis*	AKG66636.1 ABI54226
25	ABC-transporter ATPase	+	225	SunT superfamily	68 (152/225) 62 (140/226)	4e-108 1e-88	*Lactobacillus salivarius* Phage (P335-group), *Lactococcus lactis*	WP_081510396 ABI54227
26	Phage protein	+	128	N-acetyltransferase family	55 (60/109) 46 (31/67)	4e-35 3e-13	*Streptococcus pyogenes* Phage 315.4, *Streptococcus* A-group	WP_080262024 NP_795573
27	RNA-binding protein	+	126	ASCH-domain containing protein	46(58/127) 42 (52/123)	1e-34 2e-27	Treponema sp Phage psiM100 *Methanothermobacter*	OJF75869 NP_071814
28	Terminase	+	184	Small subunit	28 (38/138) 28 (40/141)	4e-10 7e-10	*Lactobacillus futsaii* Phage *Lactobacillus equigenerosi*	WP_057815933 WP_054653973
29	Terminase	+	389	Large subunit, PBSX family	51 (220/431) 49 (211/433)	2e-154 3e-147	*Lactobacillus mucosae* Phage LL-H, *Lactobacillus Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*	WP_034540174 YP_001285878
30	Phage portal protein	+	521	SPP1 Gsp6-like	41 (210/509)	2e-116	*Weissella jogaejeotgali*	CCC56327.1
31	Hypothetical protein	+	67	-	-	-	-	-
32	Minor head capsid protein	+	332		34 (104/307)	6e-57	*Weissella jogaejeotgali*	WP_075269149
33	Capsid protein	+	94		31 (26/83)	9e-04	*Lactobacillus plantarum*	WP_063491228
34	Phage scaffolding protein	+	201	Phage protein Gp20 family	40 (73/182)	9e-34	*Lactobacillus rhamnosus*	WP_064657837
35	Major capsid protein	+	368		57 (168/297) 50 (150/299)	6e-113 5e-94	Leuconostocaceae bacterium Phage IPP24, *Streptococcus pneumoniae*	WP_089940226 APD22435
36	Head-Tail Connector Protein	+	132	Phage protein Gp6-Gp15 family	35 (47/134)	2e-18	*Novibacillus thermophilus*	WP_077719111
37	Minor capsid protein	+	114	C-terminal sequence similarity to surface carbohydrate biosynthesis enzymes	37 (41/112)	1e-13	*Streptococcus uberis*	WP_046388785
38	Minor capsid protein	+	137	Minor capsid 2 family	39 (51/131) 34 (43/127)	5e-22 1e-15	*Listeria monocytogenes* Phage PH15, *Streptococcus gordonii*	WP_061668548 YP_001974368
39	Minor capsid protein	+	133	Minor capsid 3 family	31 (40/129) 27 (27/99)	2e-09 1e-06	*Lactococcus lactis* Phage 5093, *Streptococcus thermophilus*	WP_058209852 YP_002925106
40	Phage protein	+	257	Ig-like domain, with ChW repeats(COG5492)	40 (97/242) 55 (50/91)	3e-38 4e-19	*Lactobacillus vaccinostercus* Phage BF, *Serratia marcescens*	KRM61031 AQW88630
41	HP	+	118		35 (42/120)	5e-12	*Novibacillus thermophilus*	WP_077719116
42	Phage protein	+	205	Phage protein Gp15 family	31 (63/203)	2e-26	*Lactococcus lactis*	WP_058225089
43	Tail Measure Protein	+	1274		49 (605/1240) 43 (477/1274)	0 9e-106	*O. oeni* Phage bIL309, *Lactococcus lactis*	WP_050496444 AAK08398
44	Tail protein	+	243	Sipho-tail family pfam05709	33 (81/243) 23 (55/236)	2e-30 2e-15	*Leuconostoc lactis* Phage PH15, *Streptococcus gordonii*	WP_055308112 YP_001974374
45	Phage endopeptidase	+	2094	N-terminal region with conserved domain TIGR01665	26 (558/2173) 29 (491/2170)	8e-127 2e-50	*O. oeni* Phage PH15, *Streptococcus gordonii*	WP_080291852 YP_001974375
46	HP	+	61	-	-	-	-	-
47	HP	+	119		25 (31/123)	5e-04	*Lactobacillus plantarum*	WP_023466874
48	HP	+	146	Conserved domain conj_TIGR03752	28 (34/122)	3e-05	*Plasmodium relictum*	CRH01145
49	HP	+	108		37 (39/105)	7e-08	*Aureobasidium melanogenum*	KEQ58580
50	Holin	+	177	Superfamily 6 (Holin_LLH)	33 (36/110)	2e-05	*Lactobacillus ozensis*	WP_056965761
51	Muramidase	+	363	Lysozyme GH25_muramidase	56 (113/201) 44 (98/225)	2e-81 2e-57	*O. oeni* IOEB_0501 Phage P335, *Lactococcus lactis*	KEP88195.1 NP_839940

Les analyses ont été effectuées le 23 août 2017 par Psi BlastP ; les BBH bactériens et phagiques sont indiqués.

4. Autres phages unk

Des amorces PCR ont été dessinées sur les gènes associés à la réplication (orf6), de la grande sous-unité de la terminase (orf29), d'une protéine mineure de capside (orf32), de la TMP (orf43), de l'endopeptidase (orf45) et de la lysine (orf51) du phage unk162.1. Les séquences ciblées sont spécifiques du génome de unk162.1. Ces amorces ont été testées sur tous les phages unk issus du millésime 2014 ainsi que les 5 phages non ABCD isolés sur le millésime 2015. Tous les phages ont répondu aux PCRs et ont donné les mêmes tailles d'amplicon, indiquant une grande conservation au sein du cluster unk, comme décrit en général pour les clusters des phages lytiques (Mavrich & Hatfull, 2017). Seul le phage unk27.1a, isolé de moût (cépage rouge) n'a pas répondu à la PCR correspondant au gène associé à la réplication. Il a donc été sélectionné pour le séquençage.

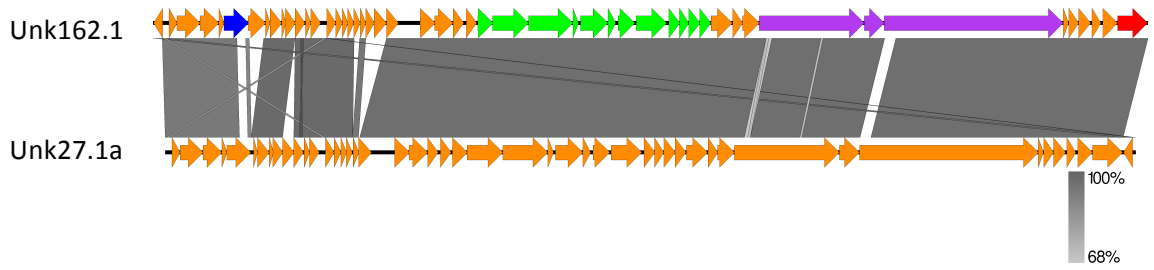


Figure 41. Comparaison des phages unk162.1 et unk27.1a

Les données présentées **Figure 41** confirment quelques différences au sein du module de réplication, ainsi que dans la séquence du gène codant l'endopeptidase. Globalement, le groupe des phages unk est homogène.

Partie IV. Génomique comparative des oenophages et perspectives d'études

Nos travaux montrent une diversité très importante des oenophages. Grâce aux inventaires réalisés, nous avons mis en évidence **l'existence de phages strictement lytiques**. Ces phages sont génétiquement distants des phages tempérés associés à *O. oeni*. L'alignement des génomes selon leurs identités nucléotidiques (ANIb) a été réalisé (les données sont disponibles en annexes). L'étude a été menée en collaboration avec Fety Jaomanjaka, en utilisant blastn avec Jspecies (Richter *et al.*, 2016). Les phages X et unk ont peu ou pas d'identité avec les phages tempérés (ANIb <70%). L'examen des couvertures (qui correspondent aux portions des séquences alignables entre deux génomes) permet de compléter l'analyse et indique que les phages X partagent quelques courtes identités nucléotidiques avec les phages D comme évoqué précédemment. Les phages unk partagent également de courtes séquences avec des phages A et B. Parmi les phages tempérés, le cluster D se distingue clairement. La matrice montre une situation complexe pour les phages A, B et C dont la majorité sont rassemblés dans quatre grands groupes.

Pour évaluer les relations évolutives entre les génomes des phages, une analyse phylogénomique a été réalisée avec l'outil VICTOR (Meier-Kolthoff & Göker, 2017) disponible en ligne (https://victor.dsmz.de). Les distances nucléotidiques entre les génomes entiers des oenophages ont été calculées avec la méthode dite GBDP (Genome-BLAST Distance Phylogeny) (**Figure 42**). L'arbre montre que les phages tempérés D sont génétiquement plus proches des phages lytiques unk et X que des phages du super-groupe ABC. Ceci est confirmé par analyse de la robustesse par «bootstrap». L'arbre montre deux groupes de phages qui sont éloignés en terme d'évolution. Le super-groupe ABC se divise en trois clusters, et chacun contient des phages de types A, B et C capables d'échanger des séquences. Cependant, les valeurs de bootstrap indiquent que les branches ne sont pas robustes à l'intérieur du super-groupe.

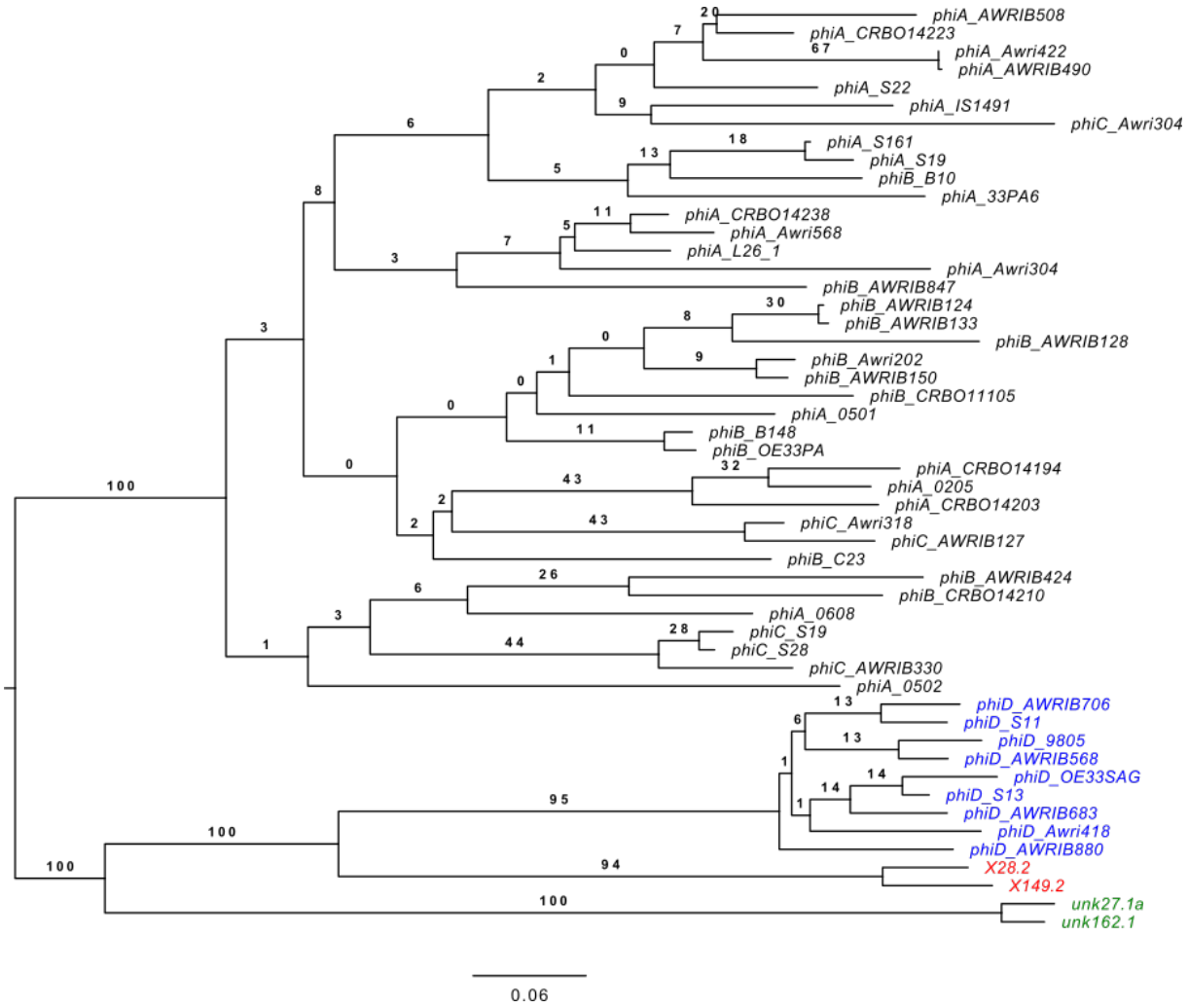


Figure 42. Relations phylogénétiques entre les oenophages. Arbre phylogénétique réalisé par l'outil VICTOR, après calcul de distances GBDP. L'arbre a été construit par la méthode FastME (Lefort *et al.* 2015).

Si les génomes sont traditionnellement analysés sur des méthodes basées sur l'alignement des séquences nucléotidiques (**Figure 43**) ou la comparaison de leurs protéines, les approches peuvent se révéler inefficaces pour des séquences très divergentes. Une alternative disponible est l'évaluation de la fréquence des tétranucleotides au sein des génomes, méthode particulièrement adaptée pour caractériser les populations de phages et évaluer les relations évolutives (Siranosian *et al.*, 2015). Nous avons procédé à l'analyse et les valeurs de fréquence d'usage tetra ont été calculées. La matrice de distance entre ces fréquences entre les différents oenophages est disponible en annexe**.** Elle a été utilisée pour construire un arbre phylogénétique par Neighbour Joining **(Figure 43**). Le génome de référence de la souche PSU-1 d'*O. oeni* a été ajouté, ainsi que celui de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293. La prise en compte de ces souches dans l'arbre nous permet d'appécier les relations ancestrales entre les phages (Pride *et al.*, 2006b) et l'influence de l'hôte sur l'évolution du génome du phage.

Nous observons que par analyse tetra les phages lytiques professionnels X et unk forment des groupes distants des phages tempérés. Ceci est en accord avec les analyses de Deschavanne *et al.* (2010). Au sein des phages tempérés, les phages possédant une intégrase D forment bien un cluster. La signature est proche de celle de l'hôte. Les prophages D sont stables dans le génome et ces phages s'excisent peu et échangent peu de gènes avec d'autres oenophages dans l'environnement. Une meilleure adaptation des phages D à l'état de lysogénie est donc suggérée.

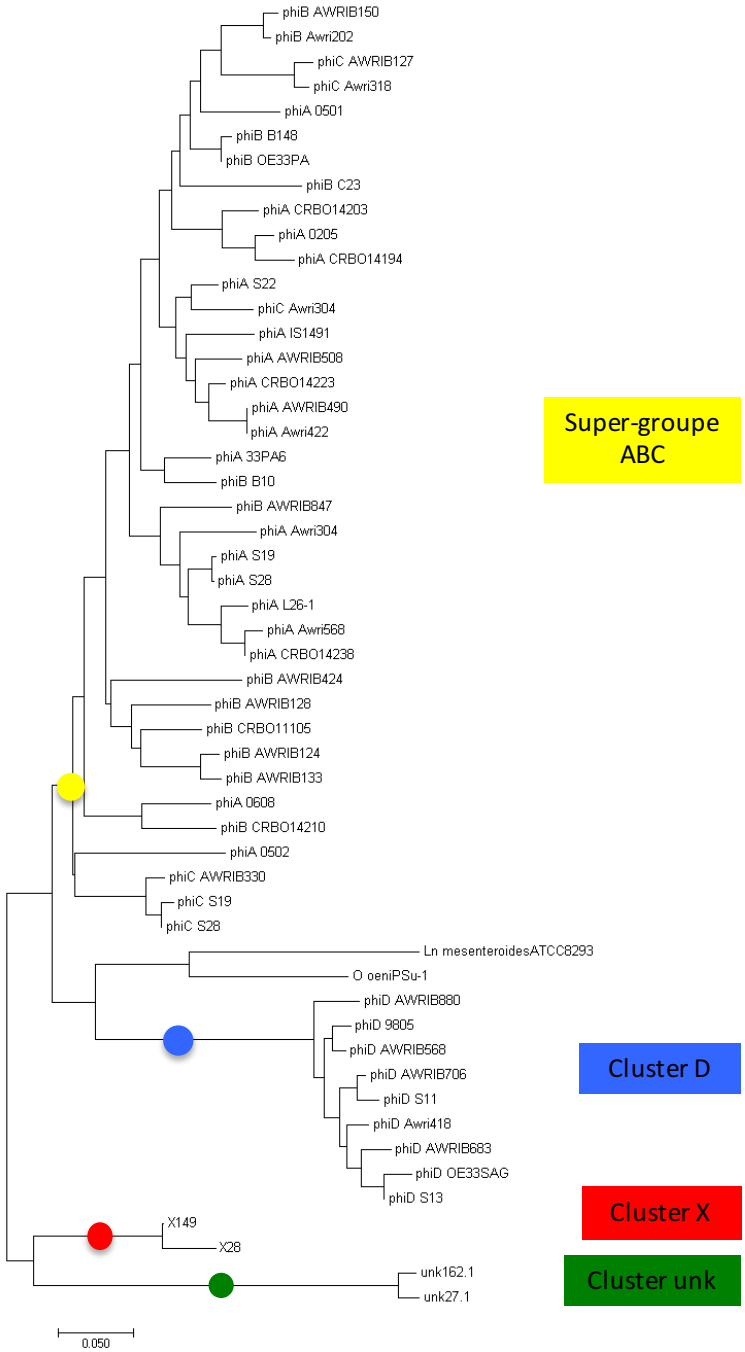


Figure 43. Arbre phylogénétique Tetra réalisé avec MEGA7 par la méthode de Neighbor-Joining.

Au sein du super-groupe ABC, il est remarquable que les phages non inductibles 0502, S19(C) et S28 (C) sont réunis dans un même groupe. Les autres phages C sont distants, et associés dans des groupes comportant des phages A et B. Il est possible que ces autres phages C soient actifs.

La phylogénie des phages est complexe et plusieurs études ont cherché un équivalent au gène ARN16S utilisé chez les bactéries. Chez les mycophages la TMP est utilisée et la phylogénie de cette protéine à elle seule donne des résultats comparables à ceux obtenus par l'analyse des génomes complets (Smith *et al.*, 2013). Chez les siphophages, le gène *tmp* peut représenter jusqu'à 20% du génome phagique et nous avons voulu savoir si les arbres obtenus donnaient les mêmes résultats. Nous avons donc comparé les séquences protéiques des TMP associées aux phages ABC (TMP1, TMP1del, TMP2, TMP2bis, TMP3, TM3bis, TM4 et TMP4del), D (TMP5), X et unk. L'arbre est présenté **Figure 44**.

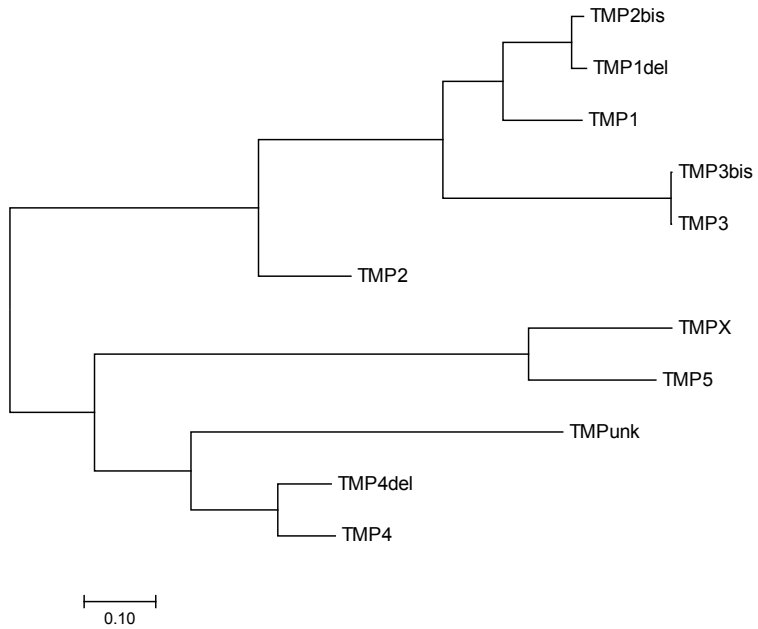


Figure 44. Arbre phylogénétique des protéines TMP des oenophages (NJ, MEGA7).

Les protéines TMP permettent bien de distinguer les phages de type D (MTP5), X (TMPX) et unk (TMPunk). En outre, l'arbre met en évidence un cluster des TMP de type 4 et 4del. Ces protéines sont associées au prophage de la souche IOEB 0502 (intA) et aux prophages des souches S28, S19 et Awri330 (type intC). Il a été montré que ces prophages étaient soit non inductibles (ϕ0502) soit qu'ils ne s'excisaient jamais seuls (cas des prophages C). Ceci nous amène à supposer que la protéine de type TMP4 est la signature des oenophages cryptiques.

De plus, l'arbre montre une proximité entre les protéines TMP1, TMP1del, TMP2bis et les TMP de type 3. Ces types de TMP sont distribués chez les phages de type int-A, int-B et int-C et ne sont pas associés à une architecture particulière.

La TMP de type 2 est retrouvée à part, et représente le type le plus fréquent chez les phages isolés d'échantillons de vin, dans cette étude ainsi que dans les travaux antérieurs (Jaomanjaka, 2014).

L'existence de phages professionnellement lytiques échappant au schéma de typage disponible actuellement révèle la nécessité de développer de nouveaux outils moléculaires permettant leur détection et leur suivi dans les échantillons œnologiques.
La mise en place d'amorces ciblant les différents clusters de TMP pourrait permettre une première approche de typage de l'ensemble des oenophages connus à ce jour. La détection des TMP2 et 3 pourra être recherchée en premier, ainsi que les TMPX et unk.
Chez les phages identifiés comme tempérés du super-groupe ABC, la détermination du type d'intégrase reste un indicateur du site d'insertion sur le chromosome bactérien, et reste un outil indispensable au suivi de la stabilité de la lysogénie.

CHAPITRE III

Interactions entre les phages et leurs hôtes bactériens en présence de composés phénoliques

Partie I. Modulation du développement lytique des oenophages en présence de composés phénoliques

Le vin contient différents composés phénoliques dont le vaste et complexe spectre d'action a été démontré sur des modèles bactériens et viraux. Dans le vin, Lee *et al.* (1985) et Henick-Kling *et al.* (1986b) ont montré les effets négatifs des acides phénols sur le développement d'oenophages. Une étude plus détaillée de l'impact des composés lors de la prédation des oenophages sur leur hôte a été initiée au laboratoire pendant la thèse de Fety JAOMANJAKA (2014). Le premier objectif a été d'identifier des molécules capables de moduler le développement lytique des oenophages, en suivant une approche sans a priori. Pour ce faire, les composés phénoliques d'un vin rouge de cépage Cabernet Sauvignon ont été extraits, puis fractionnés par chromatographie de partage centrifuge (CPC). Un ensemble de 32 fractions enrichies en composés phénoliques ont été obtenues, et chacune a été testée dans un modèle d'infection dans lequel le phage lytique (OE33PA) infecte son hôte *O. oeni* IOEB S277 en milieu MRS. Les premières expériences ont mis en évidence un retard significatif de la lyse en présence des fractions F9 et F11. Ces fractions d'intérêt ont alors été caractérisées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS). La fraction F9 a montré la présence majoritaire d'un stilbène, le resvératrol, sous forme *trans* et *cis,* et de 2 flavonols, la quercétine et la myricétine. Les composés majoritaires retrouvés dans la fraction F11 sont l'acide *p*-coumarique (un acide phénol), ainsi que la quercétine et la myricétine. La poursuite de ces travaux m'a été confiée et j'ai testé chacun des composés identifiés sous forme purifiée, afin de mettre en évidence quelle(s) molécule(s) est/sont impliquée(s) et de mieux décrire les mécanismes sous-jacents.

1. Optimisation des conditions expérimentales

• Les molécules à tester dans ce travail, soit les *trans*- et *cis*-resvératrol*,* la quercétine, la myricétine et l'acide *p*-coumarique, ont été obtenues auprès de plusieurs fournisseurs (Sigma-Aldrich ou Extrasynthèse). Dans les vins, ces composés sont retrouvés à des concentrations variables, de l'ordre de 0,5 à 300 mg/l (Ghiselli *et al.*, 1998). Il a été rapporté que, selon la molécule considérée, certaines de ces concentrations peuvent entraîner une action inhibitrice directe sur la croissance bactérienne (Krieger-Weber, 2017) ainsi que sur l'activité des phages (Henick-Kling *et al.*, 1986b). Dans un premier temps, nous avons réalisé une gamme de concentrations pour chaque molécule. L'objectif

était d'identifier la concentration la plus forte qui soit (a) compatible avec celle retrouvée dans le vin, (b) sans effet sur la croissance bactérienne, (c) sans effet sur l'intégrité des particules virales, et ceci sur la durée de l'expérience d'infection (70 heures) . Ces gammes ont donc été testées séparément sur chaque partenaire, la bactérie et le phage. Les solutions-mères des composés ont été préparées dans de l'éthanol (5%), afin d'assurer la solubilité des molécules dans le milieu MRS. Les témoins réalisés lors de nos essais présentent cette concentration finale d'éthanol de 5% et il est à noter que celle-ci ne modifie pas la croissance de la bactérie. En outre, nous avons vérifié que l'addition des molécules phénoliques ne provoque aucune variation de pH : le pH est maintenu stable à 4,8 ± 0,05. La **Figure 45** présente l'effet sur la croissance bactérienne d'*O. oeni* IOEB S277 de différentes concentrations, entre 10 et 100 µg/ml, en myricétine et en acide *p*-coumarique.

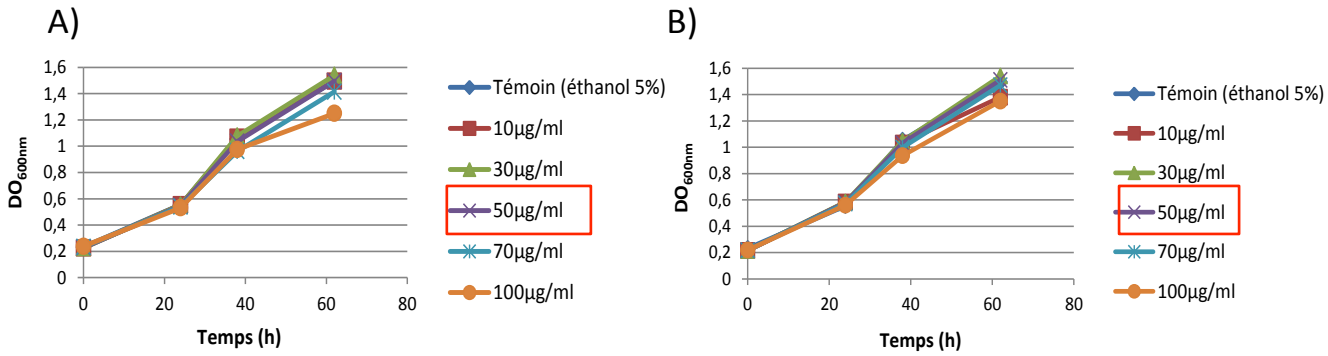


Figure 45. Détermination de la CMI par suivi de DO_{600nm}. Exemples de la myricétine (A) et de l'acide *p*-coumarique (B).

Nous notons que la concentration de 100 µg/ml, que ce soit avec la myricétine ou l'acide *p*-coumarique, impacte la croissance des bactéries. De même, à 70 µg/ml, la myricétine affecte le développement bactérien. Ainsi, avons-nous retenu comme concentration de travail, celle de 50 µg/ml pour ces deux composés, ainsi que pour les autres molécules candidates (données non montrées).

• Les molécules phénoliques à la concentration de 50 µg/ml ont ensuite été ajoutées à un lysat du phage OE33PA. Les résultats obtenus avec la quercétine, la myricétine et l'acide *p*-coumarique sont présentés en exemple dans la **Figure 46**. Après une incubation de 72h à 25°C, aucune modification du titre du lysat n'a été observée. Le même résultat a été obtenu pour les autres composés.

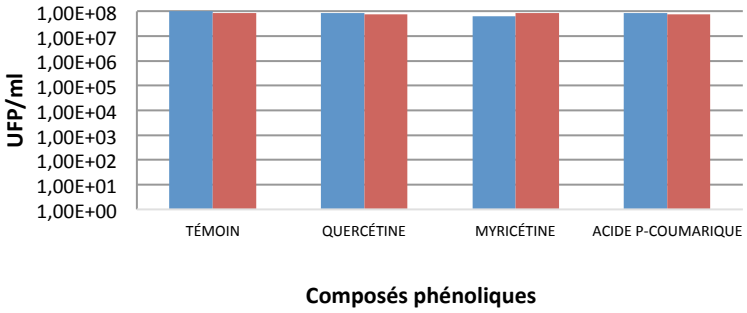


Figure 46. Stabilité des phages en présence de polyphénols. Titre du phage OE33PA en MRS avec/sans composé phénolique (50 µg/ml) à T=0 (en bleu) et T=72h (en rouge)

2. Effet des molécules phénoliques d'intérêt sur le cycle lytique

2.1. Effet de la quercétine sur le phage OE33PA

Une culture de la souche sensible IOEB S277 préparée en MRSΦ est séparée en deux en début de phase exponentielle (DO=0,1). La moitié reçoit la quercétine (50 µg/ml), et l'autre constitue le témoin. Chaque partie est subdivisée à son tour en deux, et l'un des échantillons est infecté par le phage à la MOI de 1/300 (**Figure 47**). L'évolution de la lyse en présence et en absence du composé phénolique est mesurée par suivi de DO, et par dénombrements sur milieu gélosé. Le milieu « Jus de Raisin » (JR) a été retenu pour une croissance plus rapide des colonies.

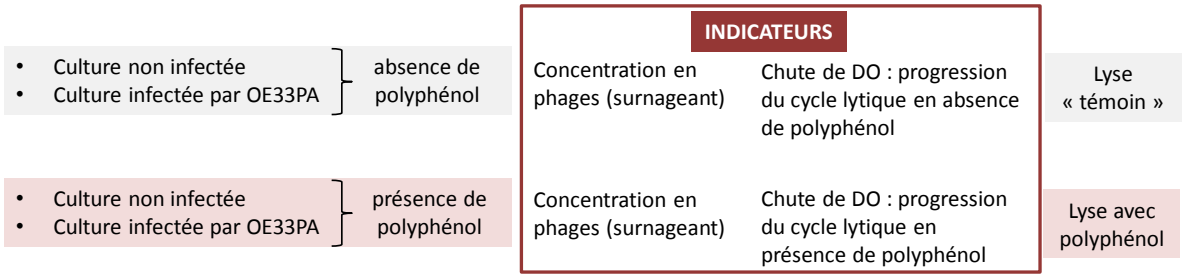


Figure 47. Schéma de réalisation des essais et indicateurs suivis.

Trois essais indépendants ont été menés et les MOI réelles mesurées (0,0029, 0,0026 et 0,0031) sont en accord avec la valeur ciblée au départ à savoir 0,003. Les résultats sont présentés sur la **Figure 48**. Nous observons que les courbes d'infection avec ou sans quercétine sont similaires entre 0 et 28h pour toutes les conditions testées. A partir de 28h, la lyse est observée dans l'essai infecté en l'absence de quercétine. La lyse est décalée dans le temps et n'est amorcée qu'à partir de 40h

d'incubation en présence de ce composé phénolique. La présence de quercétine à 50 µg/ml se traduit donc par un retard de la lyse d'environ 10h. De plus, la population en fin de lyse reste plus élevée en présence de quercétine.

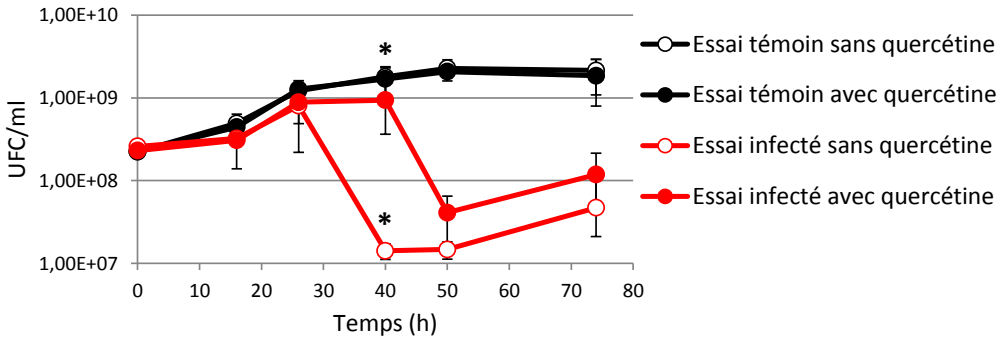


Figure 48. Effet de la quercétine sur le cycle lytique de OE33PA (n=3).

Les expériences ont été reproduites en modulant la MOI. Nous avons testé une MOI plus forte (0,1 – 1/100) et une plus faible (0,002 – 1/500), en comparaison à la MOI de 0,003 (1/300) (**Figure 49**).

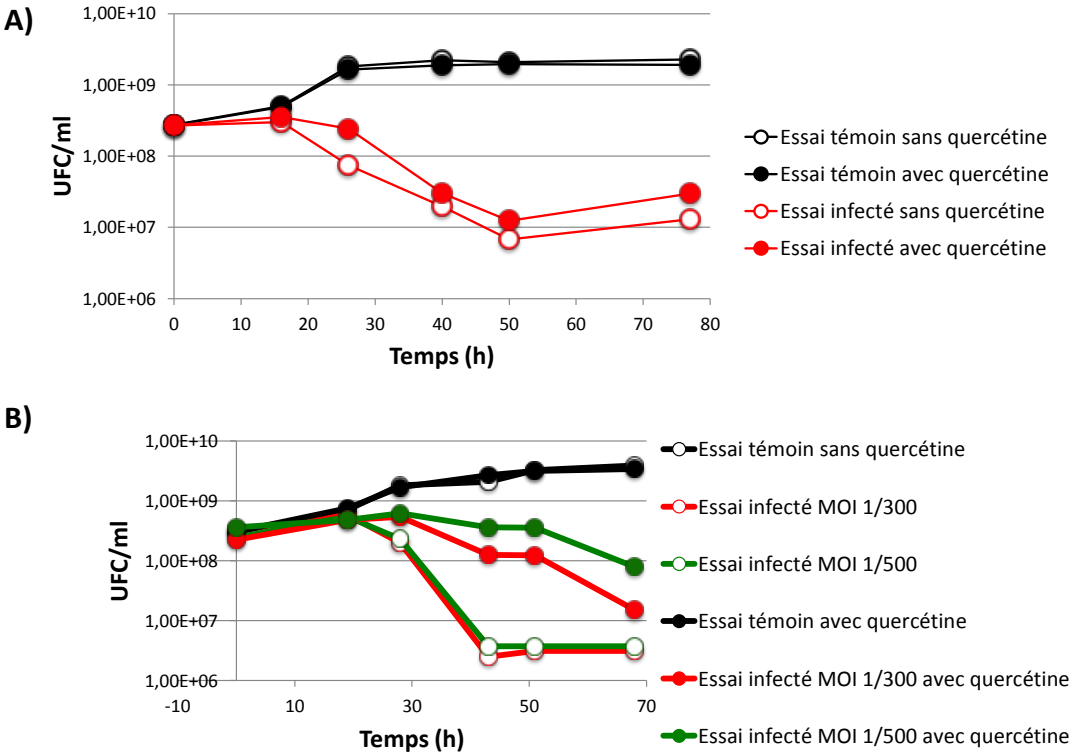


Figure 49. Impact de la MOI sur l'effet de la quercétine. A) MOI forte (1/100) ; B) MOI faible (1/500) et MOI « contrôle » (1/300).

Nos résultats montrent que le phénomène de retard de lyse obtenue grâce à la quercétine n'est que très peu visible avec une MOI plus élevée de 0,1. De plus, nous notons que dans ces conditions, la lyse est plus précoce et démarre vers 15 heures d'incubation. Par contre, pour l'essai à une MOI plus faible (1/500), l'impact de la quercétine est encore plus important. Ces expériences montrent donc que la lyse est d'autant plus retardée en présence de quercétine que les conditions de multiplicité d'infection (MOI) sont faibles. Ceci suggère que le phénomène pourrait être lié à une interaction entre la quercétine et la bactérie et qu'une période de contact significative entre la bactérie et le composé soit nécessaire. Nous avons conservé la MOI de 0,03 (1 phage pour 300 bactéries) pour la suite des travaux.

2.2. Effet de la quercétine sur le phage unk67.1

L'analyse de génomique comparative des oenophages a montré l'existence de plusieurs clusters différents. Nous avons donc voulu tester un second phage dans notre dispositif : il s'agit du phage unk67.1, à développement strictement lytique et génétiquement distant de OE33PA. Nous avons comparé l'action de la quercétine sur les deux phages, OE33PA et unk67.1, dans une même série d'expériences et les résultats sont présentés **Figure 50**. A une MOI de 0,03, le phage OE33PA provoque, comme précédemment observé, une lyse après 25 heures d'infection, en l'absence de quercétine. C'est également le cas pour unk67.1. En présence de quercétine, le retard d'infection de OE33PA est significatif dès 35 heures confirmant nos observations antérieures, alors qu'aucun retard significatif n'est observé dans la lyse induite par le phage unk67.1 dans les mêmes conditions (**Figure 50 A**), ainsi qu'en présence de MOI plus faibles (résultats non montrés). Afin de confirmer l'ensemble de ces résultats, la population phagique néo-formée au cours de l'expérience a été mesurée (**Figure 50 B**). Le nombre de particules virales de OE33PA est réduit de manière significative aux temps 24, 48 et 72 heures en présence de quercétine, alors que le titre en phage unk67.1 est stable, en présence ou absence de quercétine.

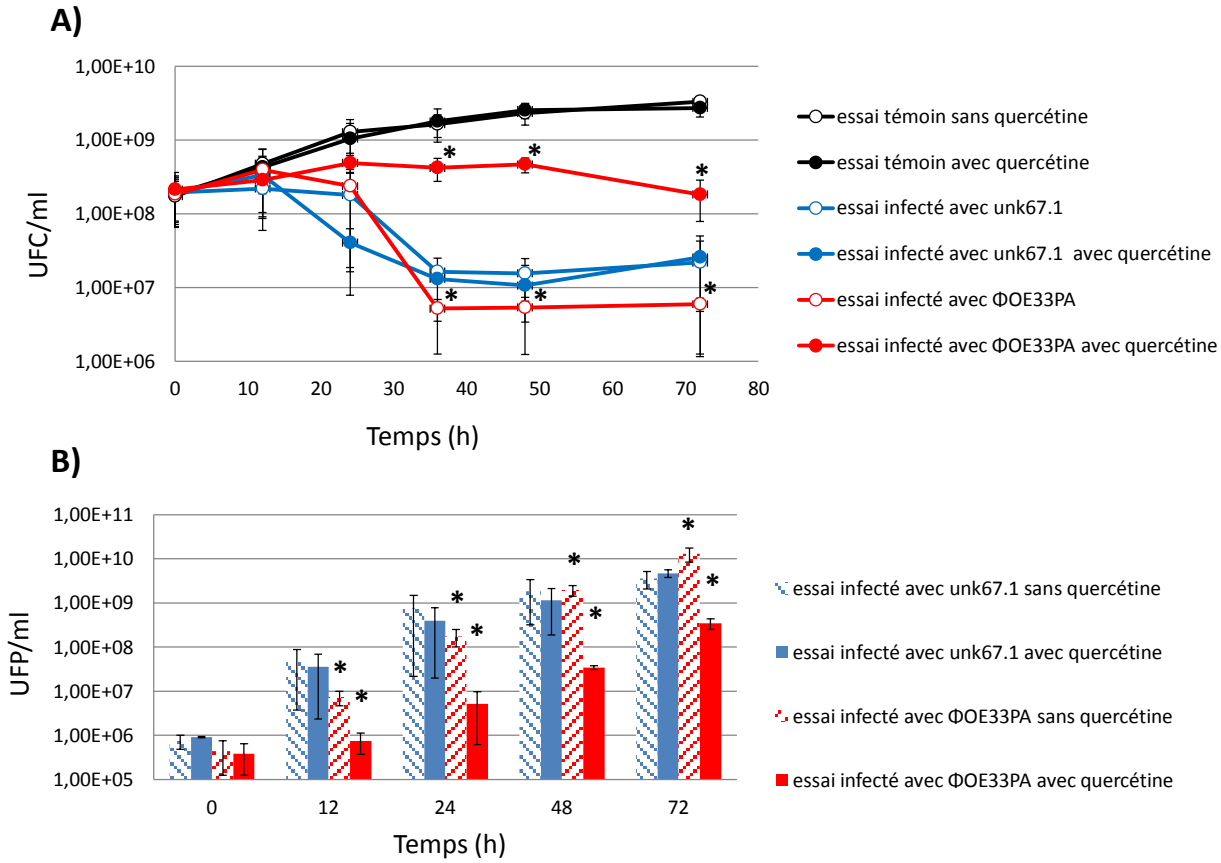


Figure 50. Effet de la quercétine sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1 à une MOI de 0,03. Le suivi des infections a été réalisé par dénombrement bactérien sur gélose au jus de raisin (A) ; le dénombrement des particules virales contenues dans le surnageant a été réalisé par la technique de la double couche en utilisant la souche sensible *O. oeni* IOEB S277 (B).

La mesure de deux indicateurs complémentaires (populations bactérienne et phagique) est en faveur d'un moindre développement lytique de OE33PA sur sa bactérie hôte lorsque les cellules se sont développées en présence de quercétine. De façon surprenante, ce composé phénolique ne modifie pas le cycle lytique du phage unk67.1.

2.3. Effet des autres molécules phénoliques contenues dans les fractions F9 et F11

Les fractions actives F9 et F11, outre la quercétine, contiennent d'autres molécules en quantité majoritaire, à savoir le *trans*-resvératrol, la myricétine et l'acide *p*-coumarique. Chaque molécule a été à son tour testée sur les deux phages. Dans chaque série, la quercétine a été testée en parallèle servant de contrôle positif interne. Au préalable, la recherche d'une concentration n'inhibant pas la croissance et n'inactivant pas les phages a été effectuée (comme détaillé dans le cas de la quercétine) : celle-ci est choisie à 50 µg/ml pour toutes les molécules.

• **Le resvératrol** ne montre aucune action significative sur le développement lytique des phages OE33PA et unk67.1 (**Figure 51**). Les niveaux de populations bactérienne et virale restent inchangés en présence/absence du composé.

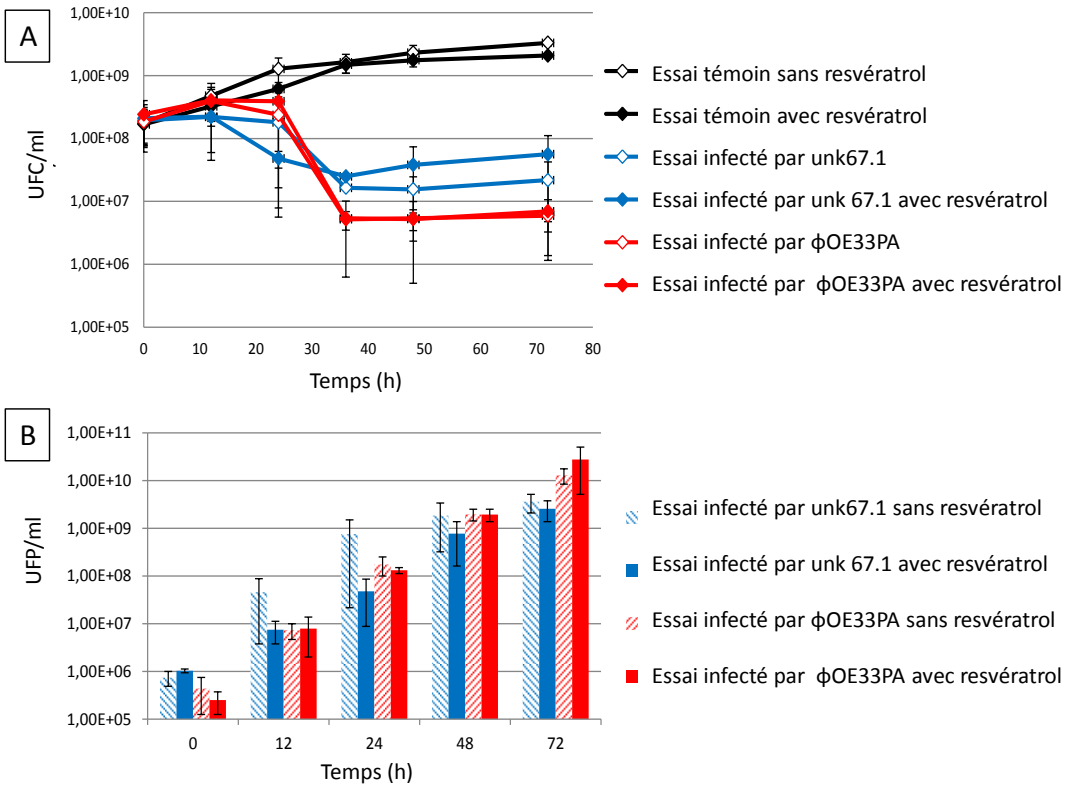


Figure 51. Effet du resvératrol sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1. Le suivi des infections a été réalisé par dénombrement bactérien (A) ainsi que par dénombrement des particules virales contenues dans le surnageant (B).

• La myricétine et l'acide *p*-coumarique montrent des effets similaires à ceux de la quercétine, indiquant un développement lytique moindre pour le phage OE33PA, alors qu'aucun effet significatif n'est mesuré pour le phage unk67.1 (résultats non montrés).

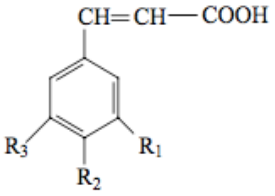
3. Mécanismes d'action possibles des composés phénoliques

3.1. Effet d'autres molécules

Nous avons élargi l'étude à d'autres molécules phénoliques de structure proche de celles présentes dans les fractions F9 et F11, dont un stilbène, le picéide, forme glycosylée du resvératrol, fréquemment associé au vin. Deux acides phénoliques supplémentaires, les acides caféique et

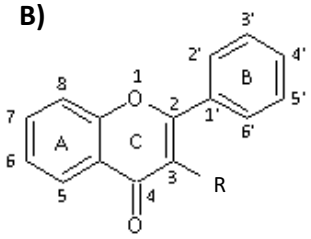
cinnamique ont été également ajoutés (**Figure 52 A**), ainsi qu'une flavone (l'apigénine) et 4 flavonols (**Figure 52 B et C**). Dans ce dernier groupe, les molécules testées diffèrent par le nombre et la position des fonctions hydroxyle phénolique –OH, ou possèdent des fonctions méthylées. Le vin contient également des flavonols sous leur forme héteroside. Aussi nous avons inclus à l'étude la quercétine-3-O-glucuronide.

A)



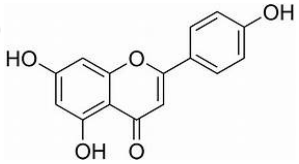
Acides hydroxycinnamiques	R1	R2	R3
Acide coumarique	H	OH	H
acide caféique	H	OH	OH
acide cinnamique	H	H	H

B)



Flavonols	2'	3'	4'	5'	R	7
Quercétine	H	OH	OH	H	OH	OH
Quercétine-3-O-glucuronide	H	OH	OH	H	acide glucuronique	OH
Myricétine	H	OH	OH	OH	OH	OH
Kaempférol	H	H	OH	H	OH	OH
Morine	OH	H	OH	H	OH	OH
Rétusine	H	OCH3	OCH3	H	OCH3	OCH3

C)



Apigénine

Figure 52. Structure des acides phénoliques (A), des flavonols (B) et de la flavone testés (C).

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau XLIII.**

Tableau XLIII. Effets observés dans le développement lytique en présence de composés phénoliques

Molécule	**ΦOE33PA**	**Unk67.1**	**Rep bio.**
Famille des flavonols			
Quercétine	+	-	3
Quercétine-3-*O* glucuronide	-	-	1
Myricétine	+	-	2
Kaempférol	-	-	2
Morine	+	-	2
Rétusine	+	-	2
Famille des flavones			
Apigénine	+	-	2
Stilbènes			
Resvératrol	-	-	2
Picéide	-	-	2
Famille des acides phénoliques			
Ac. coumarique	+	-	2
Ac. caféique	+	-	1
Ac. cinnamique	+	-	1

Rep bio : nombre de réplicats biologiques, réalisés avec des cultures bactériennes indépendantes. Chaque mesure de dénombrement bactérien a été réalisée en test en gouttes en duplicat.

• Le picéide (50 µg/ml) n'entraine aucune modification significative des cinétiques d'infection des deux phages testés.

• Comme l'acide *p*-coumarique, les acides caféique et cinnamique (50 µg/ml) inhibent le développement lytique du phage OE33PA, alors qu'ils sont sans effet sur le cycle du phage unk67.1. Les acides phénoliques semblent donc interférer avec le cycle viral de OE33PA. D'autres molécules actives sont également identifiées comme l'apigénine (flavone) ainsi que deux flavonols, la morine et la rétusine. Comme évoqué précédemment, leur effet est spécifique du phage OE33PA. Il est à noter que parmi toutes les molécules actives identifiées dans ce travail, la morine est celle qui exerce l'effet le plus important sur le phage OE33PA (**Figure 53**).

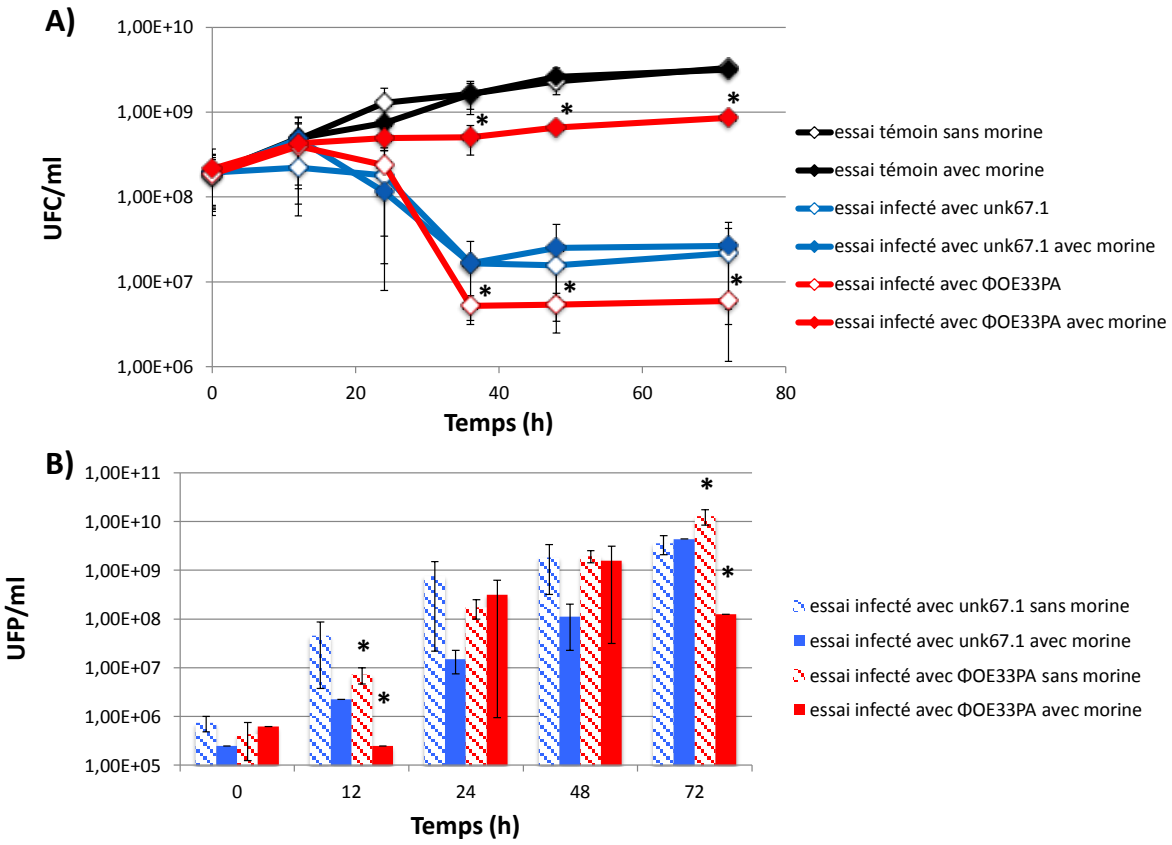


Figure 53. Effet de la morine sur le cycle lytique des phages OE33PA et unk67.1. Le suivi des infections a été réalisé par dénombrement bactérien (A) et par dénombrement des particules virales contenues dans le surnageant (B).

L'hétérogénéité de réponse à l'intérieur du groupe des flavonols est remarquable. Elle suggère que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles peuvent être liés au retard observé dans l'infection lytique de OE33PA. Nous pouvons remarquer que le kaempférol, seule molécule qui ne présente pas d'activité sur les phages testés, présente le moins de groupements hydroxyles sur le cycle B (**Figure 52**). La morine, molécule très active sur le cycle lytique, montre une seule différence

par rapport au kaempférol, et possède un seul groupement OH supplémentaire sur la position 2'. Selon Cushnie et Lamb (2011), l'hydroxylation de la position 2' est importante pour l'activité anti-bactérienne, mais la présence de groupements hydroxyles sur le cycle A ou sur la position 4' peut également favoriser cette activité. Dans le cas de la quercétine, la présence d'un glucoside en position 3 sur le cycle C supprime l'effet sur le cycle lytique observé pour la quercétine. L'hydroxylation de ce site améliore également l'activité anti-microbienne des flavonols selon Otsuka *et al.* (2008).

En conclusion, nous montrons que la cinétique de développement lytique du phage OE33PA sur son hôte est limitée en présence de composés phénoliques. Le phénomène est lié à la structure des molécules ajoutées. Les différences de structures peuvent moduler la fixation directe des molécules sur l'enveloppe bactérienne et/ou leur entrée dans la cellule. Le transport des composés quercétine, quercétine-3-glucoside et la rétusine a été récemment décrit chez *E. coli* et *Bifidobacterium* sp. (Said *et al.*, 2016). Beaucoup de ces éléments restent peu caractérisés chez *O. oeni.* La fixation des composés phénoliques sur l'enveloppe extérieure de la bactérie peut moduler l'adsorption du phage sur sa cellule hôte. L'interaction des composés peut se faire avec des composés de la paroi et/ou avec la bicouche lipidique. Enfin, plusieurs travaux montrent que la quercétine est susceptible de moduler l'expression génique chez différents microorganismes, entraînant notamment des modifications de l'enveloppe. Chez *S. cerevisiae*, la quercétine module les voies de signalisation cellulaire en lien avec le métabolisme des sucres, l'intégrité cellulaire et la réponse au stress oxydant (Vilaça *et al.*, 2012). Des travaux similaires sont rapportés chez des bactéries associées au tractus gastro-intestinal. Ainsi, en présence de quercétine (50 µg/ml), *Enterococcus caccae* surexprime les gènes impliqués dans la production d'énergie, et réprime les gènes associés à la réponse au stress, la traduction et le transport des sucres (Firrman *et al.*, 2016). Enfin Gopu *et al.* (2015) montrent que la bactérie à Gram négatif *Chromobacterium violaceum* réduit l'expression de tous les phénotypes associés au *quorum-sensing* en présence *de* quercétine (80 µg/ml) (production de violacéine, formation de biofilm, production d'exopolysaccharides, motilité et production d'alginate).

3.2. Effet des flavonols sur l'adsorption du phage OE33PA

Afin d'évaluer la modification éventuelle de l'enveloppe sous l'action des composés phénoliques, nous avons mesuré les taux d'adsorption du phage OE33PA sur son hôte en absence ou en présence de quercétine ou de morine (50 µg/ml) (**Figure 54**). Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le temps de contact entre les composés phénoliques biologiquement actifs et les cellules pouvait

constituer un paramètre important dans le retard de lyse observé. C'est pourquoi, la souche IOEB S277 a été pré-incubée en présence de chaque molécule, pendant 24h avant de procéder au test d'adsorption.

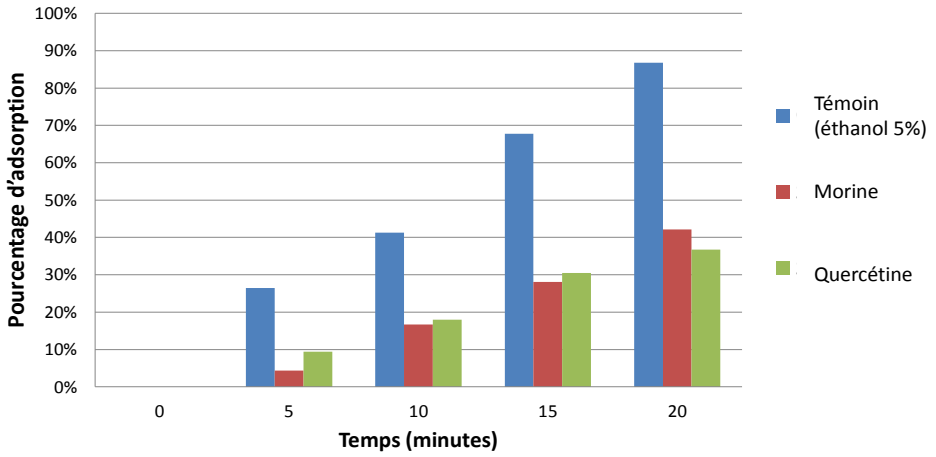


Figure 54. Adsorption du phage OE33PA sur la souche IOEB S277 en présence de flavonols (morine ou quercétine à 50 µg/ml). L'expérience a été réalisée en 2 réplicats indépendants, dont un est présenté.

Dans la condition témoin (MRS avec 5% d'éthanol), plus de 80% des phages OE33PA sont adsorbés après 20 min de contact avec l'hôte. Ce taux d'adsorption est considérablement réduit, de l'ordre d'un facteur 2, en présence de quercétine ou de morine (40% après 20 min). Nos résultats suggèrent donc que la quercétine et la morine ont un effet inhibiteur au niveau de la première étape du cycle viral, à savoir l'adsorption. Nous ne pouvons toutefois pas exclure qu'ils influencent d'autres étapes ultérieures.

Un phage est dans l'incapacité d'infecter son hôte si les récepteurs de celui-ci deviennent inaccessibles ou bien non-complémentaires à l'anti-récepteur phagique. Les récepteurs bactériens jouent un rôle crucial dans l'émergence de la résistance à l'attaque phagique. Selon Labrie *et al.* (2010), la résistance à l'adsorption relève de trois mécanismes : le blocage des récepteurs phagiques (par mutation), la production d'EPS masquants et enfin la présence d'inhibiteurs compétitifs. Le troisième mécanisme est basé sur une compétition entre le phage et des molécules qui reconnaissent les mêmes récepteurs.

3.3. Comparaison des modalités d'adsorption des phages OE33PA et unk67.1 sur leur hôte bactérien

Nous avons montré que certains composés phénoliques (i) limitent le cycle lytique du phage OE33PA et (ii) agissent à l'étape de l'adsorption du virus sur la paroi de la bactérie. Etant donné que le phénomène n'est pas observé chez le phage unk67.1 dans ces mêmes conditions, il est possible que l'adsorption de ce phage diffère et ne relève pas des mêmes structures que celles qui gouvernent l'adsorption de OE33PA sur *O. oeni* IOEB S277. Ces structures correspondent à l'anti-récepteur viral, situé à l'extrémité des parties caudales des siphovirus, et au récepteur bactérien, qui chez les bactéries à Gram positif est le plus souvent associé au peptidoglycane ou aux acides téichoïques (Bertozzi Silva *et al.*, 2016).

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les deux phages utilisent des récepteurs de nature différente chez *O. oeni*. Dans le cadre de ces expérimentations, nous avons utilisé le phage unk162.1 dont les profils génétiques (profils RAPD, PCR spécifiques) sont identiques à ceux de unk67.1. Une culture de *O. oeni* IOEBS277 a été infectée en présence de chaque phage, OE33PA ou unk162.1. L'incubation des deux essais d'infection a été réalisée sur plusieurs jours, donc prolongé bien au-delà de la phase de lyse dont le début est généralement situé vers 30 h post-incubation sans composé phénolique. Nous avons alors observé, dans les cas des bactéries infectées par l'un ou l'autre des phages, une reprise de croissance, traduisant l'émergence de bactéries résistantes (**Figure 55**). Afin d'avoir plus d'informations sur ces bactéries devenues résistantes, nous avons sélectionné ces mutants insensibles, nommés BIMs. Vingt clones ont été isolés pour chaque condition. Il a été montré (i) que leur profil VNTR est similaire à celui de la souche originale et (ii) qu'il ne s'agit pas de clones lysogènes. Enfin leur résistance au phage de challenge (OE33PA ou unk162.1) a été vérifiée (**Tableau XLIV**). Les pourcentages de BIMs sont de **55** et **85%** lors de l'infection avec OE33PA et unk162.1, respectivement.

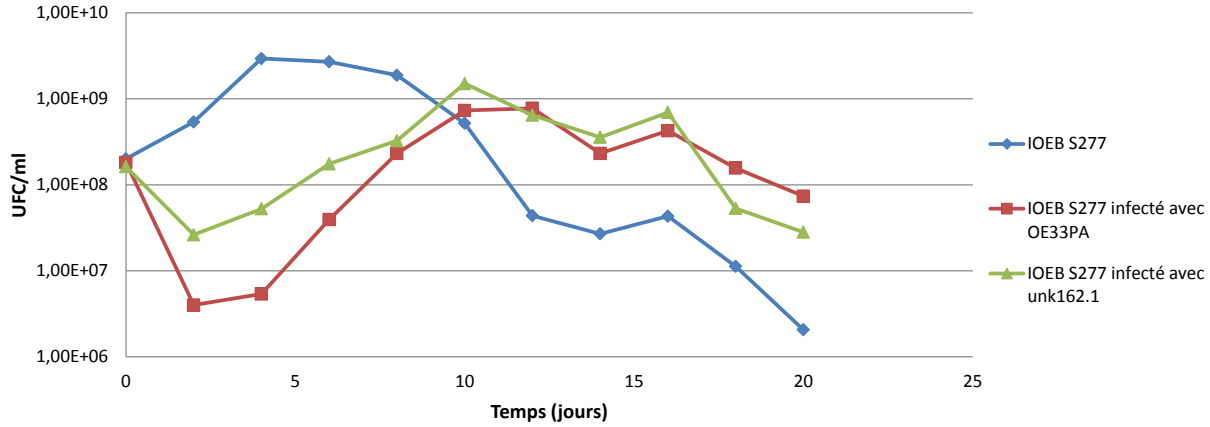


Figure 55. Courbes d'évolution des populations résistantes en fin de lyse lors de l'infection de *O. oeni* IOEB S277 en présence de OE33PA ou de unk162.1.

Sur les bactéries devenues résistantes à un type particulier de phage (OE33PA ou unk162.1), nous avons ensuite procédé à des tests croisés de sensibilité aux phages de challenge (**Tableau XLIV**). Les clones résistants au phage OE33PA demeurent sensibles aux phages unk162.1 et unk67.1. De même, les clones résistants au phage unk162.1 sont toujours sensibles au phage OE33PA. Enfin, les clones ayant subi les challenges successifs par les deux phages (BIM double) sont résistants à OE33PA et à unk162.1. Ces résultats suggèrent bien que les phages OE33PA et unk utilisent des récepteurs différents sur la paroi de *O. oeni*.

Tableau XLIV. Sensibilité des BIMs aux phages de challenge

	OE33PA	Unk162.	Unk67.1
IOEB S277	1	1	1
BIM17-OE33PA	R	1,33E+00	1,40E+00
BIM14-unk162.1	7,78E-01	R	R
BIM10-double	R	R	R

Les eop sont représentés ; R indique une résistance (eop < 10^{-7})

3.4. Analyse comparative des gènes phagiques responsables de l'adsorption sur la bactérie hôte

• Nous avons comparé les génomes des deux phages OE33PA et unk162.1 au niveau du module contenant les gènes gouvernant la reconnaissance de l'hôte. Les gènes codant les composants de la plaque basale (base plate) sont situés entre les gènes *tmp* et *lys* chez les *Siphovirus*. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel HHpred en collaboration avec Christian Cambillau (AFMB UMR 7257, AMU). Les premiers résultats sont présentés dans le **Tableau XLV**.

Tableau XLV. Annotation des ORFS associés à la reconnaissance de l'hôte

OE33PA		**Unk162.1**	
N°orf	Fonction putative	N°orf	Fonction putative
0020	terminase	Gp16	terminase
0040	portal	Gp17	portal
0050	Clp protease		Clp protease
0060	MCP (capsid)	08	MCP (capsid)
0080	connector	09	connector
		10	stopper
0100	Tail terminator		
0110	MTP evolved	13	MTP evolved
0140	TMP: 1613 aa => 240 nm	31	TMP: 1274 aa => 185nm
0150	Dit evolved (2 CBMs)	17	Dit short
0160	Tal short (p2 like)	18	Tal long and evolved
0170	RBP (phage p2 like)		
0190	Holin?		
0200	Lysin	24	Lysin

L'architecture des queues des deux phages est classique par rapport aux connaissances disponibles chez les Siphoviridae. Elle est basée sur trois composants : la TMP, les protéines dites « tail tube protein » ou MTP, et la « tail terminator protein » (TTP). Les bactériophages possédant une longue extrémité caudale doivent réguler finement la longueur du tube, et ceci est effectué par la TMP. Le gène codant la TMP est le plus long dans le génome viral. De plus, la longueur de la queue est souvent corrélée directement avec la longueur du gène *tmp* (Katsura & Hendrix, 1984). C'est bien le cas pour OE33PA et la prédiction de taille de la queue selon la taille du gène (240 nm) est en accord avec la taille observée en MET (276 nm). Par contre, il y a une différence de taille pour le phage unk162.1 (185 nm *vs* 300 nm). Nous allons prochainement contrôler l'assemblage du génome du phage unk162.1 et renouveler nos observations des particules en MET.
Les trois représentants (TMP, MTP et TTP) sont bien identifiés chez OE33PA, mais la protéine « Tail terminator » n'est pas identifiée chez unk.

A l'extrémité de la queue, des différences notables sont observées entre les phages. **Le phage OE33PA** possède une plaque basale complexe, dont la structure est proche de celle décrite chez les phages de type 936 infectant les lactocoques. Dans ce groupe, le composant essentiel dans l'adsorption est le RBP (baseplate-associated receptor binding protein) situé à l'extrémité de la queue, qui interagit avec les saccharides pariétaux bactériens, excepté c2 qui interagit avec la protéine bactérienne Pip. La plaque basale comporte également les protéines Dit (Distal Tail Protein) et Tal (Tail-Associated Lysin). Les protéines Tal possèdent fréquemment un domaine dit "peptidoglycan hydrolytic domain", dont le rôle est de dégrader localement la paroi afin d'augmenter les capacités d'adsorption du phage et/ou sa capacité à infecter des cellules possédant

des parois cellulaires fortement réticulées. La protéine Tal de OE33PA contient deux motifs de fixation aux sucres (CBM) insérés dans sa séquence et est dite « évoluée » par rapport aux phages ne les possédant pas (Veesler & Cambillau, 2011). **Le phage unk162.1** présente une importante différence qui est l'absence de RBP identifiable. La protéine Dit présente est classique et ne contient pas de domaine CBM intégré comme d'autres phages de BL (Dieterle *et al.*, 2017).

Elle est homologue à la protéine Dit d'un prophage de *L. monocytogenes* (e-value $2{,}6.e^{-14}$). La protéine Tal est atypique. Elle contient les classiques 400 premiers acides aminés des Tals courtes (Sciara *et al.,* 2010) et cette portion est suivie d'un long appendice qui porte 2 CBMs, comme retrouvé dans les phages de type P335 chez *Lc. lactis* (Mahony *et al*., 2017) ainsi que certains phages de *S. thermophilus* (Cambillau, données non publiées). Chez les phages PL1 et PLE3 infectant *Lb. casei* et dépourvus de RBP, il a été proposé que les protéines Dit évoluées remplacent le RBP dans la fixation des saccharides pariétaux bactériens (Dieterle *et al*., 2016). Chez le phage unk162.1, la protéine Tal pourrait assurer une telle fixation. Chez le phage LLH infectant *Lb. delbruecki*, la fibre caudale de 35 nm est constituée d'un hexapolymère flexible de la protéine Gp71, et joue le rôle d'antirécepteur phagique en se fixant aux LTA pariétaux bactériens (Munsch-Alatossava & Alatossava, 2013).

• La présence de deux modules distincts chez les phages OE33PA (Dit-Tal-RBP) et unk162.1 (Dit-Tal) nous a conduit à rechercher la présence des gènes plus largement dans notre collection de phages, qui sont répartis en clusters ABC, D, X, et unk. Nous avons observé que le module associé au phage OE33PA (sous cluster B) est retrouvé chez les autres membres du cluster ABC : chez les phages de cluster C, et chez de nombreux A. Le module associé au phage unk162.1 est quant à lui retrouvé chez les phages A restants, ainsi que chez le phage X. Afin de compléter la recherche, la sensibilité des clones BIMs résistants aux phages OE33PA ou unk162.1 a été évaluée vis-à-vis des phages X149 (cluster X), et L26, 14203 et 0608 (sous-cluster A) (**Tableau XLVI**). Les phages contenant le module Dit-Tal-RBP de type OE33PA résistent au mutant résistant à OE33PA. A l'opposé, les phages contenant le module Dit-Tal de unk162.1 sont résistants au mutant résistant à unk162.1. Il est intéressant de noter que deux prophages (C23B et O205A) contiennent le RBP identifié chez OE33PA, mais les structures Dit et Tal sont différentes : ces deux prophages sont non inductibles chez *O. oeni*.

Tableau XLVI. Sensibilité d'oenophages aux BIMs

Souches	Phages/composition de base plate					
	OE33PA Cluster ABC Dit-Tal-RBP	Unk162.1 Cluster unk-D Dit-Tal	phage X149 Cluster X Dit-Tal	phiL26 Cluster ABC Dit-Tal	14203 Cluster ABC Dit-Tal-RBP	0608 Cluster ABC Dit-Tal-RBP
IOEB S277	1	1	1	1	1	1
BIM17-OE33PA	R	1,33E+00	6,25E-01	1,56E+00	R	R
BIM14-unk162.1	7,78E-01	R	R	R	6,67E-01	4,21E-01
BIM10-double	R	R	R	R	R	R

Enfin, il est intéressant de noter que les phages strictement virulents unk et X contiennent le module atypique sans RBP. Ces phages sont distants par rapport aux phages tempérés jusqu'ici associés à *O. oeni*. Ceci signe l'évolution des phages vis-à-vis de leur hôte et les remaniements génétiques se déroulant dans l'écosystème rendant les phages de mieux en mieux adaptés à leur hôte.

3.5. Observation des cellules en MET après exposition aux flavonols

Les structures reconnues par les anti-récepteurs des phages de BL sont associées au peptidoglycane ou aux acides téichoïques. Certains éléments de la littérature suggèrent l'existence de modifications de la morphologie des cellules des BL du vin en présence de composés particuliers (Stivala *et al.*, 2014). D'autres suggèrent la synthèse d'EPS comme chez *S. aureus* (Hirai *et al.*, 2010). Afin de visualiser de potentielles modifications de morphologie des bactéries lors de leur incubation en présence de composés phnéoliques, nous avons observé, en MET, la surface des cellules bactériennes en absence ou en présence de flavonols. Les bactéries ont été incubées 24 h en présence de quercétine ou de morine dans les conditions décrites précédemment, collectées par centrifugation, puis fixées (**Figure 56**).

L'observation de cellules allongées indique qu'elles sont en division active. Les cellules de la condition témoin montrent un cytoplasme uniforme, une paroi mince avec une capsule absente ou très mince (**Figure 56 A et B).** Lorsque les cellules sont incubées au contact de l'un des 2 flavonols actifs (quercétine ou morine), nous remarquons une modification de leur morphologie. Les cellules présentent une paroi plus épaisse et peu dense aux électrons (zone blanche). Elles sont entourées d'une structure plus irrégulière pouvant correspondre à une capsule (Dimopoulou *et al.*, 2014).

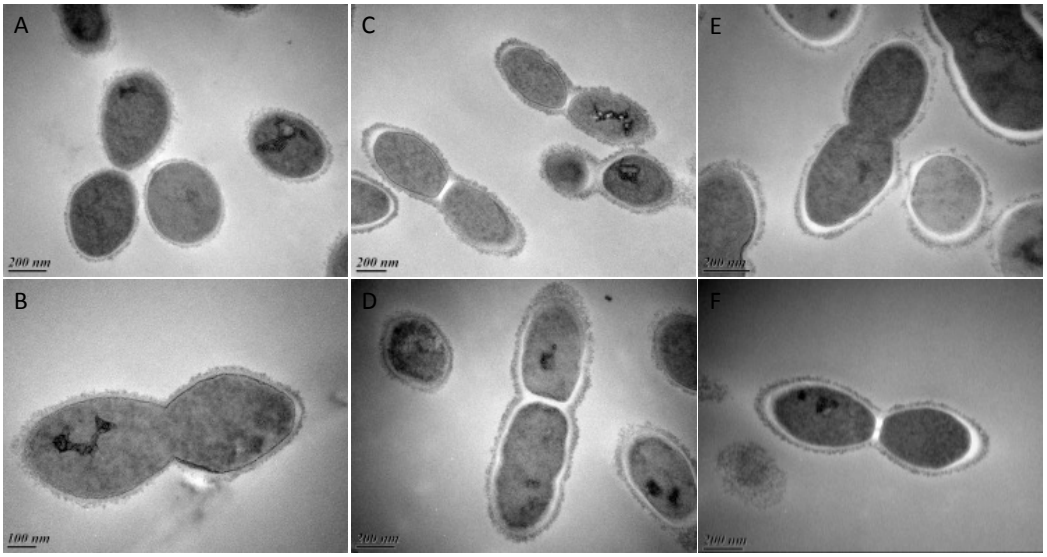


Figure 56. Observation d'*O. oeni* IOEB S277 en MET après exposition aux flavonols. Les cellules ont été incubées en milieu MRS +5% d'éthanol en l'absence de composés phénoliques (A et B) ou en milieu MRS en présence d'une solution alcoolique de quercétine (C et D) ou de morine (E et F).

Hirai *et al*. avaient noté en 2010 que les cellules de *Staphylococcus aureus* présentaient de telles structures plus irrégulières à leur surface en présence de quercétine (**Figure 57**).

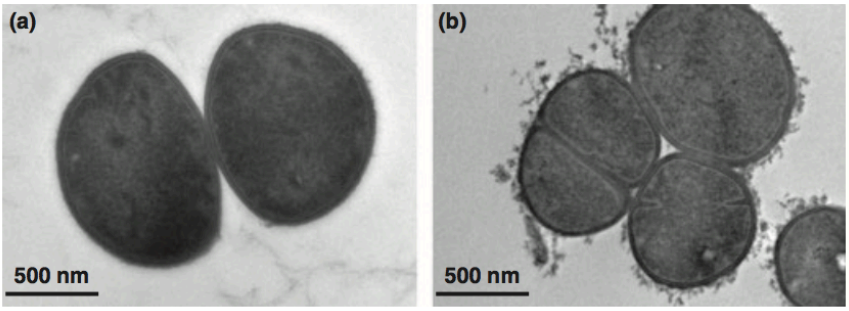


Figure 57. Observation de *S. aureus* en MET après exposition à la quercétine (Hirai *et al.*, 2010)

La distance entre la membrane et la surface de la paroi bactérienne a été calculée grâce au logiciel d'analyse d'image « imageJ ». Pour se faire, la membrane et la paroi ont été délimitées manuellement afin de calculer la distance moyenne entre ces 2 structures. Plusieurs cellules (n=5) de chaque condition ont été choisies afin de calculer l'épaisseur moyenne de la paroi selon le traitement appliqué (**Tableau XLVII**).

Tableau XLVII. Epaisseur de la paroi après traitement aux polyphénols

Condition	Epaisseur moyenne (nm)	Ecart-type
Témoin	32,894	6,967
Quercétine	59,225	11,125
Morine	61,176	12,112

Les moyennes observées pour la quercétine et la morine sont significativement différentes de la condition témoin, avec des p-value de 0,00019 et 0,007 respectivement (test de Student, XLstat).

Nos résultats montrent une augmentation significative de l'épaisseur de la paroi des bactéries après exposition à la quercétine et à la morine à 50 µg/ml pendant 24h. Afin de déterminer si une capsule de nature polysaccharidique est présente en présence de polyphénols, les préparations utilisées ont été traitées par une technique rapide de réaction de Thiery ou test PATAg (Thiery, 1967), qui permet de marquer et de contraster spécifiquement les polysaccharides (**Figure 58)**.

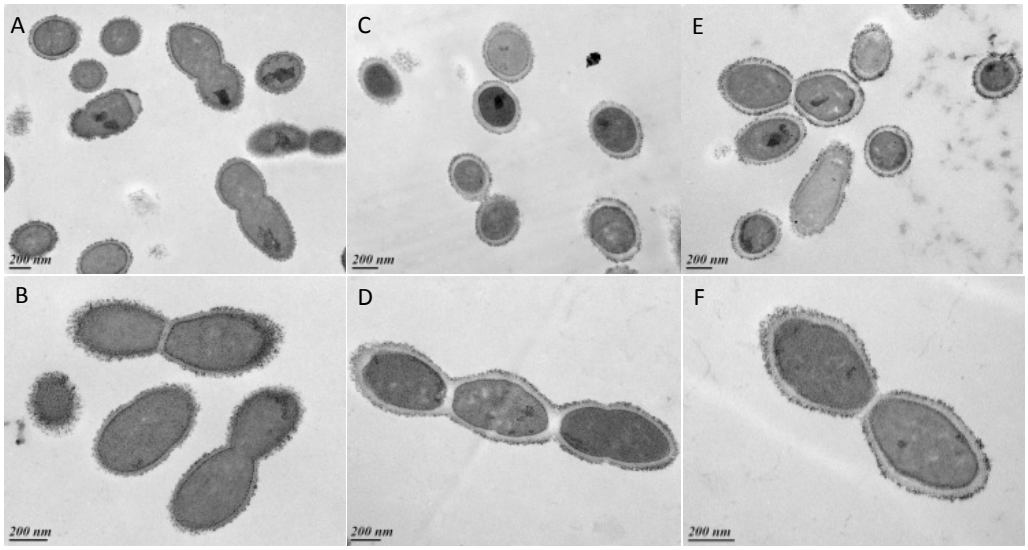


Figure 58. Observation d'*O. oeni* en MET après marquage des polysaccharides. Les cellules ont été incubées en milieu MRS +5% d'éthanol en l'absence de composés phénoliques (**A** et **B**) ou en présence de quercétine (**C** et **D**) ou de morine (**E** et **F**).

Dans la condition témoin (**Figure 58 A et B**), nous observons un contraste de polysaccharides diffus autour de la cellule. Après exposition aux flavonols **(Figure 58 C à F),** les polysaccharides contrastés se répartissent de façon moins diffuse et sont localisés à la surface de la capsule. Une partie de la paroi reste non contrastée. Nous pouvons supposer que les composés phénoliques induisent une modification de la répartition des polysaccharides. Cette modification peut changer la conformation des récepteurs aux phages ou moduler leur accès à la surface de la bactérie.

4. Conclusions et perspectives

Nos résultats mettent en évidence que certains composés phénoliques du vin peuvent moduler les interactions entre les oenophages et *O. oeni*. A des concentrations compatibles avec celles trouvées dans le vin, ces composés exerceraient un effet protecteur chez *O. oeni* vis-à-vis de la prédation par les phages. Au cours de ce travail, plusieurs molécules protectrices ont été identifiées au sein des familles des flavonols (quercétine, myricétine, morine et rétusine), des flavones (apigénine) et des acides phénoliques (acides coumarique, caféique et cinnamique). Ces composés constituent donc un paramètre supplémentaire à prendre en compte dans un environnement déjà très complexe et peu favorable à la multiplication de bactériophages sur leurs hôtes bactériens. En 1986, Henick-Kling *et al.* (1986b) avaient déjà proposé que les compositions différentes en composés phénoliques associées aux vins blancs et rouges pouvaient expliquer la différence de sensibilité des phages souvent observées entre ces deux milieux (Jaomanjaka, 2014). On pourrait également imaginer que *O. oeni* montre des sensibilités différentes aux phages selon la composition en polyphénols des vins rouges, composition dépendante notamment du cépage considéré. Il serait également intéressant à l'avenir d'évaluer une potentielle action synergique des composés sur l'activité lytique des phages.

Nous avons montré que la protection des bactéries face aux phages, engendrée par les composés phénoliques, est limitée à certaines molécules et à certains oenophages. Du point de vue des molécules actives, on note une hétérogénéité de réponse dans le groupe des flavonols. La présence d'un groupement hydroxyle en position 2' sur le cycle B de la morine semble importante puisque son absence ne permet pas de visualiser un quelconque effet de la molécule (kaempférol) sur le cycle lytique du phage OE33PA. Il en est de même au niveau du cycle C de la quercétine, et la forme hétéroside perd également son action. Les molécules identifiées agissent vraisemblablement sur l'étape de l'adsorption du phage OE33PA sur l'enveloppe, comme démontré pour la quercétine et la morine. Les mécanismes ne sont pas à ce stade complètement élucidés, et il n'est pas exclu qu'ils diffèrent selon la molécule en présence. La présence de quercétine ou de morine modifie discrètement l'enveloppe, *via* notamment un épaississement de la paroi ainsi que la présence proposée d'une capsule. Ces éléments doivent être confirmés en présence des autres molécules actives. L'impact sur les récepteurs du phage peut correspondre à une moindre exposition des récepteurs, ou encore à leur masquage par des EPS. Une troisième hypothèse à considérer est que les composés puissent se fixer sur le récepteur lui-même, et exercer ainsi une compétition avec le phage. Les glycosides de quercétine sont formés par l'établissement d'un pont *O*-glycosidique entre un sucre et le groupement hydroxyle de la quercétine, et la position généralement utilisée pour la

glycosylation sur la quercétine est la position 3-hydroxyle du cycle C. Cependant, la glycosylation sur d'autres groupements hydroxyles a été décrite (Biesaga & Pyrzynska, 2009). Les sucres peuvent être des constituants de monosaccharides, disaccharides, ou encore de polysaccharides, et ils correspondent à du glucose, du galactose, du rhamnose, et du xylose. La réaction est catalysée par des glycosyltransférases, dont on sait qu'elles sont présentes et actives chez *O. oeni* (Dimopoulou *et al.*, 2016). Or il a été montré que les phages de BL reconnaissent ces motifs au sein de polysaccharides ou de LTA dans l'enveloppe. Ainsi chez plusieurs groupes de phages de lactocoques, les variations dans la structure de ces polysaccharides pariétaux sont les facteurs déterminants dans la spécificité des phages (Ainsworth *et al.*, 2014). L'élucidation récente des structures montre qu'il s'agit de motifs tri- ou hexa-saccharidiques selon le phage étudié (Ainsworth *et al*., 2014; Bebeacua *et al.,* 2013; Chapot-Chartier *et al*., 2010; Farenc *et al.,* 2014; Mahony *et al.*, 2016; McCabe *et al.*, 2015; Spinelli *et al.*, 2014). Dans ce scénario, le composé phénolique se fixerait sur le récepteur bactérien de nature polysaccharidique, bloquant ainsi l'adsorption de OE33PA. Ceci est en accord avec (i) la durée d'incubation nécessaire en présence du composé pour visualiser l'inhibition du cycle lytique (durée de la réaction enzymatique), (ii) la perte d'activité observée pour la quercétine héteroside et enfin (ii) l'analyse moléculaire des déterminants présents sur la partie caudée de OE33PA, qui présentent des similitudes avec d'autres phages de LB reconnaissant les mêmes structures pariétales de nature saccharidique. Dans cette hypothèse, la modification de paroi observée en MET ne jouerait peut être aucun rôle dans le phénomène de retard du cycle lytique.

L'absence d'effets des composés phénoliques sur le phage unk162.1 est intéressante et suggère que les interactions entre les phages unk et *O. oeni* relèvent d'autres structures (phagique et virale) que celles mises en jeu entre OE33PA et *O. oeni*. Le phage unk162.1 montre une composition particulière à l'extrémité de la queue, et notamment l'absence de RBP. Des observations en MET de plusieurs phages contenant les deux types de structures, RBP-Dit-Tal et Dit-Tal, seront prochainement réalisées au laboratoire. Il est possible que les structures reconnues dans la paroi de *O. oeni* par unk (et X) ne soient pas des saccharides. Les phages unk et X sont des phages lytiques émergents, très distants des oenophages caractérisés à ce jour et membres des clusters ABC et D. Ces phages ont probablement évolué au contact d'autres BL comme les Lactobacilles, les Pédiocoques et les Leuconostoques et leurs phages associés présents en début de vinification.

Nos travaux permettent de disposer d'un test rapide permettant de différencier les phages selon le récepteur utilisé sur la paroi cellulaire. Ce test pourrait être appliqué aux phages infectant les Leuconostoques par exemple. Par ailleurs, l'existence d'une interférence entre les polyphénols et les

phages vis-à-vis des récepteurs bactériens est importante dans le contexte de la modulation de la composition du microbiote par les phages (Moreno-Indias et al., 2016) ainsi que pour le biocontrôle de bactéries phytopathogènes. Chez *O. oeni*, les phages lytiques n'étant pas affectés par la présence de composés phénoliques, ils pourraient toujours être utiles à une limitation des populations bactériennes lorsque la FML n'est pas désirée. Enfin, dans le domaine médical, la consommation d'aliments riches en polyphénols est recommandée dans la lutte contre les infections urinaires basses. Depuis quelques années, la phagothérapie (Xu *et al.*, 2015) est également envisagée pour traiter ces infections, et la mise en lumière d'effets antagonistes entre phages et polyphénols serait un paramètre important à considérer lors d'approches combinées polyphénols-phages.

Partie II. Modification du phénotype des colonies lysogènes obtenues sur gélose au jus de raisin

L'un des objectifs du projet ANR Lysoplus est d'évaluer l'impact de la lysogénie sur la physiologie de *O. oeni* et sa résistance au stress. Afin de juger de l'impact des prophages, la souche sensible IOEB S277 a été successivement lysogénisée par différents phages, permettant de comparer les réponses de la souche originale et de ses dérivés lysogènes. La technique d'obtention des clones lysogènes, développée par Fety Jaomanjaka (2014), consistait à dénombrer un lysat phagique sur la souche IOEB S277 par approche de la double-couche, et de prélever des bactéries à l'intérieur des plages troubles formées par les phages tempérés sur leur hôte sensible. Les bactéries étaient ensuite isolées sur gélose au jus de raisin. Au cours de cette approche, le premier isolement à partir des plages a montré une population hétérogène, constituée de colonies rouges et de colonies blanches. Sur le même milieu, la souche *O. oeni* IOEB S277 se développe habituellement sous forme de colonies blanches. L'analyse des colonies rouges a montré une modification de la texture : les colonies rouges étaient plus « sèches » et plus difficiles à prélever sur la gélose. Elles formaient comme des « billes ». Par PCR, il a été montré que ces colonies rouges correspondaient aux dérivés lysogènes, les colonies blanches correspondant à la souche originale non lysogène. Le chapitre suivant décrit les expériences complémentaires réalisées afin de comprendre le mécanisme de pigmentation associé à la lysogénie chez *O. oeni*.

1. Stabilité du phénotype

Nous avons observé que le phénotype « rouge » persiste après plusieurs séries de repiquage sur milieu au jus de raisin (JR), et à la mise en conservation à -20°C.

La stabilité du phénotype a été également évaluée en mélangeant les mono-cultures de la souche native IOEB S277 non lysogène et d'un dérivé lysogène. Les deux mono-cultures ont dans un premier temps été préparées en milieu MRS. En phase exponentielle de croissance, elles ont été mélangées en proportion variable 1/1 ; 2/1 ; 1/2. Chaque mélange a été extemporanément dilué en série, et le dénombrement a été effectué sur gélose JR. Après 4 à 5 jours, de petites colonies blanches apparaissent. Après 7 jours d'incubation, une différence de coloration entre les colonies apparaît et l'on observe des colonies blanches et des colonies rouges (**Figure 59).**

A partir de 9 jours, la différence de coloration s'estompe.

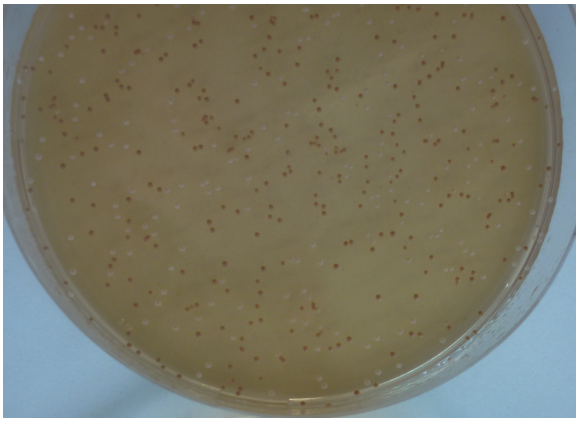


Figure 59. Différents morphotypes de colonies (rouge/blanc) observés à partir d'un mélange 1/1 des souches IOEB S277 et IOEB S277 (Aciné).

Le dénombrement a été réalisé par des stagiaires ne bénéficiant pas d'information sur la manipulation, et auxquels a été donnée la consigne de dénombrer les colonies rouges et blanches. Nous avons observé que les dénombrements réalisés étaient en accord avec les rapports de mélange imposés au départ de l'expérience (± 4%) (**Tableau XLVIII**).

Tableau XLVIII. Dénombrement de colonies issues des mélanges de souches IOEB S277 lysogène/non lysogènes S277 sur gélose JR et distributions relatives des colonies rouges et blanches.

Rapport initial	**1/1**		**1/2**		**2/1**	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
colonies blanches	46,91	1,19	30,19	2,96	65,84	3,26
colonies rouges	52,51	0,86	69,81	2,96	34,16	3,26

Les rapports appliqués correspondent à la souche IOEB S277 et à son dérivé lysogène IOEB S277 (cinéA). Les moyennes et écart-types (ET) ont été calculés à partir de 3 réplicats indépendants. Le dénombrement a été effectué par des stagiaires « candides ».

Des colonies représentant chaque morphotype (blanc et rouge) (n=14 pour chaque morphotype) ont été choisies au hasard sur la boîte du mélange 1/1 présentant plus de 100 colonies, et repiquées dans 30 µl d'eau physiologique. Une extraction sur membrane FTA a ensuite permis d'évaluer par PCR « endolysine » quelles colonies parmi celles-ci étaient lysogènes. Les 14 colonies rouges étaient toutes lysogènes (PCR « endo » positive), et les 14 colonies blanches ne comportaient aucun

prophage (PCR négative). Nous pouvons donc établir une corrélation entre la lysogénie et la coloration des colonies, et utiliser cette différence de morphotype pour reconnaître la souche native de son dérivé lysogène en mélange.

2. Le phénotype est indépendant du prophage et du site d'insertion

Les prophages chez *O. oeni* sont différents dans la nature des fonctions portées, notamment au niveau de leur moron. D'autre part, les prophages appartenant aux clusters ABC et D sont insérés en quatre sites distincts nommés A à D dans le chromosome de *O. oeni* (Jaomanjaka *et al.*, 2013). Nous avons donc évalué si le phénotype « colonie rouge » est associé à des phages particuliers et/ou à leur position dans le génome de *O. oeni*.

Dans nos expériences précédentes, le phage CineA de type A a été utilisé. D'autre part, Jaomanjaka (2014) avait observé le phénotype lors de la création de dérivés lysogènes pour des phages de B. Nous avons donc appliqué le protocole à l'obtention de clones lysogènes en présence du phage 33SAG de type D. Les colonies lysogènes obtenues ont montré la pigmentation rouge. Nous avons ensuite réalisé un mélange 1/1 des cultures des dérivés non lysogènes/lysogènes et effectué leur dénombrement (**Tableau XLIX**). De nouveau, les colonies rouges et blanches sont présentes dans un rapport 1/1. Les colonies rouges contiennent le prophage et pas les colonies blanches.

Tableau XLIX. Pourcentage de colonies blanches et rouges dénombrées à partir d'un mélange 1/1 de lysogène/non lysogène de la souche IOEB S277.

	moyenne	**ET**
colonies blanches	46,37	1,07
colonies rouges	53,63	1,07

Les souches sont *O. oeni* IOEB S277 et IOEB S277 (33SAG). Les moyennes et écart-types (ET) ont été calculés sur 3 réplicats indépendants.

Le phénotype « colonie rouge » ne dépend pas du phage utilisé, et n'est donc pas lié à une quelconque synthèse d'un composé par le prophage chez le dérivé lysogène. Par ailleurs, la position sur laquelle est intégré le prophage n'a pas d'incidence sur le phénomène. La coloration rouge n'est donc pas la conséquence d'une possible modulation de l'expression des gènes bactériens à proximité des sites d'insertion, *via* des régulateurs prophagiques.

3. La modification de phénotype est indépendante de la souche utilisée pour la lysogénisation

Les différentes constructions de lysogènes ont été réalisées chez la souche sensible IOEB S277. Nous avons appliqué le même protocole de lysogénisation à une seconde souche sensible et non lysogène, S25. Cette souche est plylogénétiquement distincte de IOEB S277 même si elle fait partie du même sous-groupe MLST A. Les essais réalisés montrent des résultats similaires chez cette souche par rapport à *O. oeni* IOEB S277 (**Tableau L)**.

Tableau L. Pourcentage de chaque morphotype de colonies (rouge/blanc) dénombré à partir du mélange 1/1 de souches S25 lysogène/non lysogènes.

	S25 / S25 (ciné)		**S25 / S25 (SAG)**	
	moyenne	ET	moyenne	ET
colonies blanches	47,99	1,14	45,68	1,80
colonies rouges	52,01	1,14	54,32	1,80

Le rapport appliqué est de 1/1. Les moyennes et écart-types (ET) ont été calculés sur 3 réplicats indépendants.

4. Exploration de l'origine de la coloration des colonies rouges

• Le jus de raisin rouge a été substitué par du jus de raisin blanc lors de la préparation de l'agar. Dans ces conditions, les clones lysogènes ne développent aucune coloration particulière par rapport à la souche originale. Cette expérience montre que la coloration rouge est liée à la présence de composés apportés par le jus de raisin rouge.

• Nous avons ensuite évalué l'impact possible de l'autoclavage sur l'apparition des composés à l'origine de la coloration rouge. Nous avons donc réalisé un milieu jus de raisin à double concentration. Il a été filtré (membrane PES, 0,22μm) et mélangé avec un même volume d'agar doublement concentré, préalablement autoclavé et maintenu en surfusion. Sur ce milieu autoclavé, le dénombrement d'un mélange de deux souches, l'une lysogène et l'autre non lysogène, montre un contraste plus fort entre les colonies rouges et les colonies blanches (**Figure 60**). La coloration rouge des colonies issues des dérivés lysogènes est liée à la présence de composés originaux dans le jus de raisin rouge.

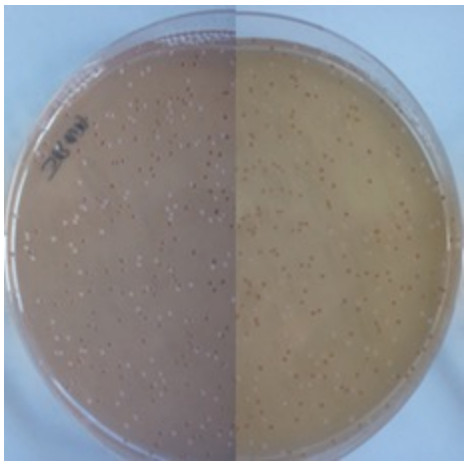


Figure 60. Mélange de bactéries lysogènes (rouges) et non lysogènes (blanches) dénombré sur milieu gélosé JR non autoclavé (à gauche) et autoclavé (à droite).

• Enfin nous avons confectionné un milieu à base de jus de raisin blanc commercial (JR blanc) enrichi en différentes fractions contenant des tanins (T) ou des tanins + anthocyanes (T+A) contenus dans le jus de raisin rouge. Les milieux ont été stérilisés par filtration. Les premiers milieux ont été préparés en ajoutant les extraits aux concentrations de 300 mg/l (T) et 650 mg/l (T+A). L'extrait contenant les anthocyanes est particulièrement hydrosoluble, et une coloration très intense est observée par rapport au milieu JR rouge (**Figure 61 A**). En présence de la fraction T+A dans la gélose JR blanc, nous pouvons remarquer une hétérogénéité de la coloration des colonies (**Figure 61 B, C)**.

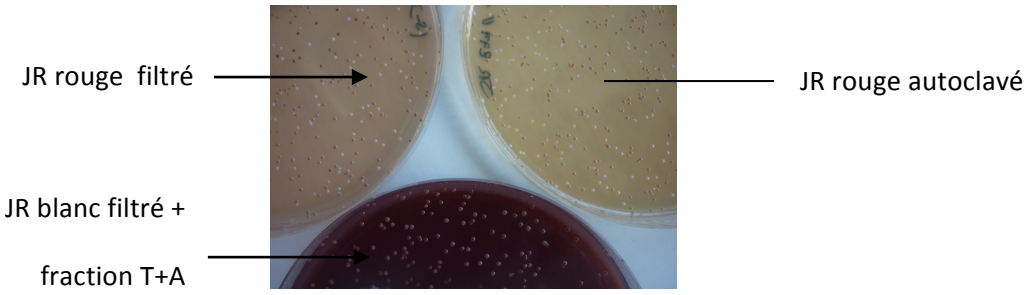


Figure 61. Aspects des colonies issues de mélanges de souches lysogène/non lysogène en présence de JR rouge et de JR blanc additionné d'extraits T+A (tanins + anthocyanes).

L'ajout des différentes fractions a été ajusté à 20 mg/l. Une coloration plus proche de celle observée dans le milieu JR rouge a été obtenue lors de l'ajout de la fraction T+A. L'ajout de ces concentrations plus faibles permet par ailleurs d'observer une croissance similaire des colonies par rapport au milieu JR initial. Après 7 jours d'incubation, une coloration des colonies est visible sur le milieu JR rouge

(**Figure 62, droite**), ainsi que sur le milieu JR blanc additionné de la fraction T+A (**Figure 62, gauche**). Aucune coloration n'est visible en présence des tanins seuls (résultats non montrés).

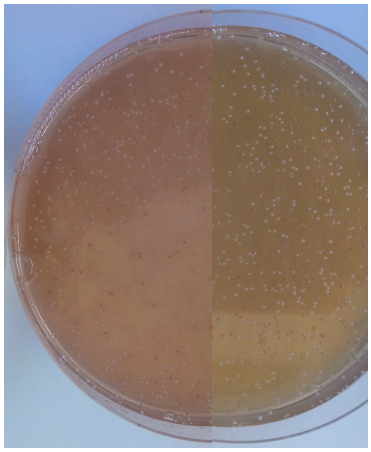


Figure 62. Aspects des colonies issues de mélanges de souches lysogène/non lysogène en présence des extraits T+A en milieu JR blanc.

Ces résultats suggèrent que la pigmentation des colonies est liée à la présence d'anthocyanes issues de la baie de raisin.

5. Conclusion et perspectives

Nous avons mis en évidence chez *O. oeni* un phénotype d'apparition de colonies rouges lorsque des colonies lysogènes sont cultivées sur un milieu gélosé au jus de raisin rouge. Le mécanisme est lié à la présence d'anthocyanes, molécules reconnues pour leur coloration rouge, dans le milieu. Le phénotype est indépendant du phage tempéré, et de son site d'insertion dans le chromosome. Il est donc associé à la lysogénie en général.

Dans des travaux antérieurs, l'apparition de clones rouges sur gélose au jus de raisin rouge a également été observée lors de l'isolement de BIMs suite à l'infection de la bactérie *O. oeni*. Ce phénomène est donc lié à un mécanisme commun aux cycles lysogénique et lytique. Il est donc possible que l'apparition de colonies rouges soit visible lorsque les cellules sont au contact de phages en cycle lytique. Ceci pourrait se produire dans une colonie d'une souche lysogène en milieu JR, où des évènements d'excision spontanée peuvent se produire. C'est également le cas lors de l'isolement de BIMs, car les colonies résistantes sont isolées en fin de lyse, à partir d'un

lysat contenant une forte concentration en phages. Il est donc envisageable qu'une protéine virale associée au développement lytique du phage s'accumule dans les colonies, et réagisse avec les anthocyanes, formant un précipité. La lysine virale pourrait être cette protéine. Le phénotype serait donc stable au repiquage pour les colonies lysogènes (ce qui est observé dans nos expériences), et serait perdu lors du réisolement des BIMs, par épuisement de la quantité initiale de lysine (ce qui a été observé par Jaomanajaka, 2014). L'interaction anthocyanes-lysozyme de blanc d'œuf est connue en œnologie. Le lysozyme peut avoir une influence sur la couleur du vin rouge, puisqu'il est capable de se lier aux polyphénols (Gerbaux *et al.*, 1999). D'autre part, la moindre efficacité du lysozyme vis-à-vis des bactéries lactiques du vin est observée en présence d'anthocyanes (Guzzo *et al.*, 2011). Notre hypothèse devra être confirmée en clonant et en exprimant les endolysines phagiques afin de démontrer leur interaction avec les fractions anthocyaniques.

Conclusion générale

Le principal objectif de ce projet de thèse était de renseigner la diversité des phages infectant l'espèce *O. oeni*. Nous avons assemblé une collection d'échantillons représentative de l'environnement œnologique de la région du Sud-ouest de la France, en prélevant des productions aux différentes étapes (moût, FA, FML), et en privilégiant des cépages, des types de vin, des domaines et des itinéraires variés. L'isolement de phages actifs à partir de ces échantillons a bénéficié de deux protocoles différents et un ensemble de 136 oenophages a été obtenu. Un typage rapide a été ensuite réalisé sur la base de travaux antérieurs menés au laboratoire. Jaomanjaka *et al.* (2013) ont en effet montré que les prophages associés aux souches d'*O. oeni* ainsi que tous les phages libres isolés à partir de vins sont tempérés, ou ex-tempérés. Leur intégration site-spécifique se produit au niveau de l'un des 4 sites tRNA (A à D) identifiés dans l'espèce. A chaque site est associée une intégrase phagique particulière. Un schéma de typage basé sur la présence de séquences signatures dans les quatre gènes *int* a été mis au point. Il a permis le typage rapide des 136 phages isolés à partir des millésimes 2014 et 2015. Les phages isolés sont majoritairement tempérés (98/136) et ils s'intègrent au niveau des quatre sites principaux déjà décrits dans l'espèce *O. oeni*. Aucun site secondaire n'est utilisé. Ces phages tempérés s'organisent en deux groupes génétiques nommés ABC et D, dont les membres ne s'échangent pas/peu de matériel génétique. Les phages D sont peu divers. Ils restent actifs et ne sont donc pas dans un processus de domestication et de perte progressive de fonctions. De multiples échanges génétiques sont détectables entre les phages ABC qui forment une mosaïque et une sorte de continuum d'entités génétiques. La diversité des phages qui possèdent une intégrase de type A est forte et nous avons d'ailleurs isolé de nouvelles architectures, non présentes dans les génomes bactériens séquencés. Les membres des deux groupes ABC et D sont différents dans leur capacité à s'induire, et, pour les phages inductibles, dans la stabilité de leur lysogénie. L'impact des spécificités de la lysogénie entre les prophages ABC et D sera à étudier plus en détail.

Les prophages chez *O. oeni* portent un ensemble de fonctions comme différents transporteurs ou encore des mécanismes de résistance aux phages, qui sont susceptibles d'améliorer l'adaptation au milieu. Chez d'autres modèles bactériens, la lysogénie peut favoriser la persistance des souches dans l'environnement. En œnologie, la lysogénie pourrait moduler l'adhésion de *O. oeni* sur les baies, et/ou sur les matériels des chais. Des expériences sont en cours pour évaluer cette hypothèse. Des dérivés lysogènes de la souche IOEB277 ont été créés et leur adhésion sur des surfaces abiotiques est en cours de caractérisation à l'U. Dijon par Stéphanie Weidmann dans le cadre de l'ANR Lysoplus. Les premiers résultats ne montrent aucun avantage adaptatif des dérivés lysogènes en culture planctonique par rapport à la souche originale. En mode biofilm, des taux d'adhésion plus élevés sont observés pour certains dérivés lysogènes par rapport à la souche IOEB S277. Les chais contiendraient

un réservoir de souches qui seraient alors transmissibles au raisin/moût. Une perspective intéressante sera également de suivre le parcours de telles souches lysogènes au cours des fermentations et de savoir comment évolue le taux de lysogénie. Suivant le taux de lysogénie initial de la population dans le moût, la nature des prophages intégrés (plus ou moins stables) ainsi que les paramètres physico-chimiques du vin (+/- inducteurs), l'évolution de la population peut être très différente. Ces éléments peuvent moduler la durée nécessaire au déroulement de la FML. Pour évaluer ces aspects, de nouveaux outils sont nécessaires, et nous avons initié une approche de ddPCR pendant la thèse. L'objectif était de comprendre l'évolution des pourcentages de souches lysogènes de type A, B, C ou D dans la population du début à la fin de FML. Ces données ont été corrélées aux dénombrements en bactéries et aux relevés de durée de FML. Les résultats montrent que les outils de ddPCR mis au point sont à même de préciser la diversité de la population lysogène (différents types de prophages présents) et d'en suivre l'évolution. Ces résultats encourageants sont présentés en Annexe.

En marge des oenophages tempérés, **l'originalité de notre étude est la mise en évidence de phages strictement lytiques capables de lyser *O. oeni*.** Leur existence n'avait jamais été démontrée. Ces phages ont été isolés fréquemment dans l'environnement et semblent ubiquitaires**.** Ils sont donc *a priori* capables d'affecter la population de *O. oeni* lorsque les bactéries se multiplient dans le vin. Ceci intervient pendant la FML et également lors de la préparation des levains en production ou pendant leur acclimatation avant inoculation. Les phages peuvent moduler la population bactérienne qualitativement (en agissant comme facteur de diversification) ou quantitativement (en réduisant la population retardant ou bloquant la FML). L'analyse phylogénétique suggère que ces phages lytiques nommés unk et X ont une origine différente de celle des oenophages tempérés. La capacité de ces phages lytiques à infecter d'autres BL du vin n'a pu être démontrée. De même, il n'y a aucune démonstration de la sensibilité de *O. oeni* à des phages infectant d'autres BL du vin. Il est donc difficile de comprendre les mécanismes qui ont permis les flux de gènes dans l'environnement et d'identifier les sources des recombinaisons à l'origine de l'émergence de phages lytiques chez *O. oeni*. Leur émergence est une manifestation de l'évolution conjointe, dite coévolution antagoniste. Dans le cas du système bactérie/phage lytique, le parasite « évolue » pour rencontrer son hôte, survivre en association avec cet hôte et se multiplier à ses dépens (en entraînant la mort de l'hôte). Dans le même temps, l'hôte évolue pour échapper au parasite, et/ou s'en défendre. Nos travaux suggèrent que ces phages lytiques professionnels ont « évolué » afin de pouvoir infecter *O. oeni* en utilisant une porte d'entrée (c'est-à-dire un récepteur) différent de celui utilisé par les phages tempérés chez *O. oeni.* Il sera intéressant de mieux caractériser le spectre d'hôte de ces phages et de

voir si les mécanismes mis en place dans l'espèce leur permettent de résister à l'attaque virale (systèmes RM ; présence de systèmes Sie prophagiques …).

Il est délicat d'étudier la microévolution des systèmes naturels et notamment des relations phage-bactérie dans le vin de par la complexité du milieu. De plus, la composition physico-chimique fluctue au cours du temps pendant les différentes étapes de la vinification. L'originalité de l'environnement œnologique est notamment la présence de composés phénoliques. Nous avons mis en évidence que certains composés (comme la quercétine ou la morine) limitent le développement lytique d'un phage ex-tempéré de type B. Nous suggérons que la croissance de la bactérie en présence de ces composés réduit l'adsorption du phage OE33PA sur son hôte. L'action peut résulter d'une synthèse de polymères sous l'action des composés phénoliques, masquant le récepteur du phage. Une autre hypothèse serait l'établissement de liaisons entre les composés phénoliques et les récepteurs pariétaux de la bactérie. Cette compétition limiterait le cycle lytique du phage sur son hôte. De façon intéressante, certains phages, dont les phages lytiques unk et X, utilisent un récepteur différent et ne sont pas limités dans leur pouvoir de prédation par les composés phénoliques. L'interaction a été démontrée en milieu MRS à pH 4,8 et il conviendra à présent d'évaluer si elle se produit également dans le vin, dont le pH varie généralement entre 3 et 4.

Un second type d'interaction entre des composés phénoliques, les anthocyanes, et le cycle lytique a été observé. Le phénomène serait à l'origine de la pigmentation rouge des colonies lysogènes sur gélose au jus de raisin rouge. Il offre un crible simple et rapide pour l'isolement de clones lysogènes chez *O. oeni* et pourrait être étendu à d'autres BL. Notre hypothèse serait que dans chaque colonie lysogène, l'excision des phages dans une partie des cellules libère la lysine, qui se complexerait alors aux anthocyanes du milieu gélosé provoquant la pigmentation des colonies. Ce phénomène existe entre le lysozyme de blanc d'œuf et les anthocyanes. Le clonage et l'expression des lysines virales devraient permettre de vérifier notre hypothèse. Les lysines phagiques ont un rôle plus important que la simple lyse des cellules infectées. Leur présence chez les Streptocoques pathogènes humains permet l'adhésion de *S. mitis* dans la cavité buccale (Edlund *et al.*, 2015) et sur les plaquettes *via* son interaction avec le fibrinogène, ce qui constitue le mécanisme central de la pathogénie dans les cas d'endocardite infectieuse (Seo *et al.,* 2010). Si cette interaction devait être confirmée chez *O. oeni*, il sera intéressant de vérifier qu'elle est possible dans les conditions du vin. L'attaque virale par des phages lytiques ou bien l'induction de prophages à partir de souches lysogènes pourrait non seulement impacter la FML, mais aussi perturber des réactions impliquant les composés phénoliques.

La caractérisation des oenophages reste à poursuivre. Au sein des *Siphoviridae*, les phages infectant les BL *Lc. lactis*, *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* et *Lb. casei* sont prédominants. La mise à disposition de nouvelles séquences de phages infectant *O. oeni* mais aussi de phages infectant les membres des genres *Leuconostoc* et *Weissella* issus de panification et de fabrications laitières (axes du projet Lysoplus) apportera des réponses aux questions de flux de gènes et d'émergence de nouveaux phages actifs sur les levains commerciaux. Ces données participeront également à la construction d'une taxonomie dans la famille des *Siphoviridae*.

Références bibliographiques

Abedon, S.T. (2015). Phage therapy of pulmonary infections. Bacteriophage *5*, e1020260.

Ackermann, H.-W. (2011). The first phage electron micrographs. Bacteriophage *1*, 225–227.

Adams, M.H. (1959). Bacteriophages.

Adriaenssens, E., and Brister, J.R. (2017). How to name and classify your phage: An Informal Guide. Viruses *9*.

Adriaenssens, E.M., Krupovic, M., Knezevic, P., Ackermann, H.-W., Barylski, J., Brister, J.R., Clokie, M.R.C., Duffy, S., Dutilh, B.E., Edwards, R.A., et al. (2017). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2016 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. Arch. Virol. *162*, 1153–1157.

Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., and Bessis, R. (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. J. Chem. Ecol. *23*, 1689–1702.

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*, e00880-00814.

Ali, Y., Koberg, S., Heßner, S., Sun, X., Rabe, B., Back, A., Neve, H., and Heller, K.J. (2014). Temperate *Streptococcus thermophilus* phages expressing superinfection exclusion proteins of the Ltp type. Front. Microbiol. *5*, 98.

Álvarez, B., and Biosca, E.G. (2017). Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture. Front. Plant Sci. *8*, 1218.

Arendt, E.K., and Hammes, W.P. (1992). Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* phages from German wines. Appl. Microbiol. Biotechnol. *37*, 643–646.

Arendt, E.K., Neve, H., and Hammes, W.P. (1990). Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. Appl. Microbiol. Biotechnol. *34*, 220–224.

Arendt, E.K., Lonvaud, A., and Hammes, W.P. (1991). Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. Microbiology *137*, 2135–2139.

Artero, A., Artero, A., Tarín, J.J., and Cano, A. (2015). The impact of moderate wine consumption on health. Maturitas *80*, 3–13.

Asare, P.T., Jeong, T.-Y., Ryu, S., Klumpp, J., Loessner, M.J., Merrill, B.D., and Kim, K.-P. (2015). Putative type 1 thymidylate synthase and dihydrofolate reductase as signature genes of a novel Bastille-like group of phages in the subfamily *Spounavirinae*. BMC Genomics *16*, 582.

Badotti, F., Moreira, A.P.B., Tonon, L.A.C., de Lucena, B.T.L., Gomes, F. de C.O., Kruger, R., Thompson, C.C., de Morais, M.A., Rosa, C.A., and Thompson, F.L. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. Antonie Van Leeuwenhoek *106*, 1259–1267.

Baess, I. (1971). Report on a pseudolysogenic mycobacterium and a review of the literature concerning pseudolysogeny. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] Microbiol. Immunol. *79*, 428–434.

Bai, J., Kim, Y.-T., Ryu, S., and Lee, J.-H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. Front. Microbiol. *7*, 474.

Baker, J.L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W., and He, X. (2017). Ecology of the oral microbiome: beyond bacteria. Trends Microbiol. *25*, 362–374.

Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B., and Momol, M.T. (2010). Phage therapy for plant disease control. Curr. Pharm. Biotechnol. *11*, 48–57.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol. *19*, 455–477.

Baptista, C., Santos, M.A., and São-José, C. (2008). Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. J. Bacteriol. *190*, 4989–4996.

Bartowsky, E.J. (2017). *Oenococcus oeni* and the genomic era. FEMS Microbiol. Rev. *41*, S84–S94.

Bartowsky, E.J., and Henschke, P.A. (Australian W.R.I. (1995). Malolactic fermentation and wine flavour. Aust. Grapegrow. Winemak. Aust.

Bastard, A. (2015). Interactions micro-organismes - bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin : fermentation malolactique par le biofilm de *Oenococcus oeni* (Dijon).

Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., and Weidmann, S. (2016). Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. Front. Microbiol. *7*, 613.

Bavaresco, L., and Fregoni, C. (2001). Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. In Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine, (Springer, Dordrecht), pp. 153–182.

Bearson, B.L., and Brunelle, B.W. (2015). Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella.* Int. J. Antimicrob. Agents *46*, 201–204.

Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J.C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., Neve, H., Cambillau, C., and Heller, K.J. (2013). X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target. Mol. Microbiol. *89*, 152–165.

Bednarz, M., Halliday, J.A., Herman, C., and Golding, I. (2014). Revisiting bistability in the lysis/lysogeny circuit of bacteriophage lambda. PloS One *9*, e100876.

Berbegal, C., Peña, N., Russo, P., Grieco, F., Pardo, I., Ferrer, S., Spano, G., and Capozzi, V. (2016). Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. Food Microbiol. *57*, 187–194.

Bertozzi Silva, J., Storms, Z., and Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. FEMS Microbiol. Lett. *363*.

Betteridge, A., Grbin, P., and Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. Trends Biotechnol. *33*, 547–553.

Biesaga, M., and Pyrzynska, K. (2009). Analytical procedures for determination of quercetin and its glycosides in plant material. Crit. Rev. Anal. Chem. *39*, 95–107.

Bilhère, E., Lucas, P.M., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2009). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 1291–1300.

Bobay, L.-M., Touchon, M., and Rocha, E.P.C. (2014). Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 12127–12132.

Boisvert, S., Laviolette, F., and Corbeil, J. (2010). Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies. J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol. *17*, 1519–1533.

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, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., and Mills, D.A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E139-148.

Bolduc, B., Jang, H.B., Doulcier, G., You, Z.-Q., Roux, S., and Sullivan, M.B. (2017). vConTACT: an iVirus tool to classify double-stranded DNA viruses that infect Archaea and Bacteria. PeerJ *5*, e3243.

Bon, E., Delaherche, A., Bilhère, 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.

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R., and Maxwell, K.L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. ISME J. *10*, 2854–2866.

Borneman, A.R., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., and Chambers, P.J. (2010). Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. Appl. Microbiol. Biotechnol. *86*, 681–691.

Borneman, A.R., McCarthy, J.M., Chambers, P.J., and Bartowsky, E.J. (2012). Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. BMC Genomics *13*, 373.

Borysowski, R.M.J. (2014). Phage Therapy (Caister Academic Press).

Brathwaite, K.J., Siringan, P., Connerton, P.L., and Connerton, I.F. (2015). Host adaption to the bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni.* Res. Microbiol. *166*, 504–515.

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.

Brüssow, H., and Desiere, F. (2001). Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. Mol. Microbiol. *39*, 213–222.

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. MMBR *68*, 560–602, table of contents.

Bruttin, A., and Brüssow, H. (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 2874–2878.

Campbell-Sills, H., Khoury, M.E., Favier, M., Romano, A., Biasioli, F., Spano, G., Sherman, D., Bouchez, O., Coton, E., Coton, M., et al. (2015). Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. Genome Biol. Evol.

Campbell-Sills, H., Khoury, M.E., Gammacurta, M., Miot-Sertier, C., Dutilh, L., Vestner, J., Capozzi, V., Sherman, D., Hubert, C., Claisse, O., et al. (2017). Two different *Oenococcus oeni* lineages are associated to either red or white wines in Burgundy: genomics and metabolomics insights. OENO One *51*, 309.

Campos, F.M., Couto, J.A., and Hogg, T.A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii.* J. Appl. Microbiol. *94*, 167–174.

Capozzi, V., Russo, P., Beneduce, L., Weidmann, S., Grieco, F., Guzzo, J., and Spano, G. (2010). Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. Lett. Appl. Microbiol. *50*, 327–334.

Cappello, M.S., Zapparoli, G., Stefani, D., and Logrieco, A. (2010). Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. Syst. Appl. Microbiol. *33*, 461–467.

Cappello, M.S., Zapparoli, G., Logrieco, A., and Bartowsky, E.J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. Int. J. Food Microbiol. *243*, 16–27.

Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., and Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP *43*, 301–312.

Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A., and Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiol. Lett. *211*, 155–159.

Carrolo, M., Frias, M.J., Pinto, F.R., 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.R., and Hendrix, R.W. (1974). Locations and amounts of major structural proteins in bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. *88*, 535–545.

Casjens, S.R., and Hendrix, R.W. (2015). Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant. Virology *0*, 310–330.

Castillo, D., and Middelboe, M. (2016). Genomic diversity of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum.* FEMS Microbiol. Lett. *363*.

Castro-Mejía, J.L., Muhammed, M.K., Kot, W., Neve, H., Franz, C.M.A.P., Hansen, L.H., Vogensen, F.K., and Nielsen, D.S. (2015). Optimizing protocols for extraction of bacteriophages prior to metagenomic analyses of phage communities in the human gut. Microbiome *3*, 64.

Cazelles, O., and Gnaegi, F. (1982). Investigations on the problem of bacteriophage development in wines. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. Switz.

Cenens, W., Mebrhatu, M.T., Makumi, A., Ceyssens, P.-J., Lavigne, R., Van Houdt, R., Taddei, F., and Aertsen, A. (2013). Expression of a novel P22 ORFan gene reveals the phage carrier state in *Salmonella typhimurium*. PLoS Genet. *9*, e1003269.

Ceyssens, P.-J., Minakhin, L., Van den Bossche, A., Yakunina, M., Klimuk, E., Blasdel, B., De Smet, J., Noben, J.-P., Bläsi, U., Severinov, K., et al. (2014). Development of giant bacteriophage φKZ is independent of the host transcription apparatus. J. Virol. *88*, 10501–10510.

Chang, Y., Kim, M., and Ryu, S. (2017). Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils. Food Microbiol. *68*, 112–120.

Chapot-Chartier, M.-P. (2014). Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. Front. Microbiol. *5*, 236.

Chapot-Chartier, M.-P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M.-Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C., et al. (2010). Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. J. Biol. Chem. *285*, 10464–10471.

Chasseriaud, L., Krieger-Weber, S., Déléris-Bou, M., Sieczkowski, N., Jourdes, M., Louis Teissedre, P., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2015). Hypotheses on the effects of enological tannins and total red wine phenolic compounds on *Oenococcus oeni.* Food Microbiol. *52*, 131–137.

Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., and Chopin, M. (2001). Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. Nucleic Acids Res. *29*, 644–651.

Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H., and Dols-Lafargue, M. (2016). Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. BMC Genomics *17*, 984.

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.

Clokie, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., and Heaphy, S. (2011). Phages in nature. Bacteriophage *1*, 31–45.

Comeau, A.M., Tétart, F., Trojet, S.N., Prère, M.-F., and Krisch, H.M. (2007). Phage-antibiotic synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. PloS One *2*, e799.

Cortés, P., Spricigo, D.A., Bardina, C., and Llagostera, M. (2015). Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. FEMS Microbiol. Lett. *362*, 1–7.

Costantini, A., Doria, F., Saiz, J.-C., and Garcia-Moruno, E. (2017). Phage-host interactions analysis of newly characterized *Oenococcus oeni* bacteriophages: Implications for malolactic fermentation in wine. Int. J. Food Microbiol. *246*, 12–19.

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.

Cumby, N., Edwards, A.M., Davidson, A.R., and Maxwell, K.L. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. J. Bacteriol. *194*, 5012–5019.

Cushnie, T.P.T., and Lamb, A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents *38*, 99–107.

Cushnie, T.P.T., Hamilton, V.E.S., Chapman, D.G., Taylor, P.W., and Lamb, A.J. (2007). Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. J. Appl. Microbiol. *103*, 1562–1567.

Czajkowski, R., Ozymko, Z., de Jager, V., Siwinska, J., Smolarska, A., Ossowicki, A., Narajczyk, M., and Lojkowska, E. (2015). Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages ΦPD10.3 and ΦPD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. PloS One *10*, e0119812.

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

Das, M., Bhowmick, T.S., Ahern, S.J., Young, R., and Gonzalez, C.F. (2015). Control of Pierce's disease by phage. PloS One *10*, e0128902.

Davies, E.V., Winstanley, C., Fothergill, J.L., and James, C.E. (2016). The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. FEMS Microbiol. Lett. *363*, fnw015.

Davis, C., Silveira, N.F., and Fleet, G.H. (1985). Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. Appl. Environ. Microbiol. *50*, 872–876.

De MAN, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. *23*, 130–135.

De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B.G., Danis-Wlodarczyk, K., and Lavigne, R. (2017). *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage-host interactions. Nat. Rev. Microbiol. *15*, 517–530.

Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., and Touqui, L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. J. Infect. Dis. *201*, 1096–1104.

De Coudenhove, P. (2015). Interactions entre *Oenococcus oeni* et ses bactériophages au cours de l'élaboration des vins. Rapport de Master 2, Bordeaux.

Deschavanne, P., S DuBow, M., and Regeard, C. (2010). The use of genomic signature distance between bacteriophages and their hosts diplays evolutionary relationships and phage growth cycle determination. Virol. J. *7*, 163.

Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., and Brüssow, H. (2002). Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek *82*, 73–91.

Diaz-Munoz, S., and Koskella, B. (2014). Bacteria–phage interactions in natural environments.

Dicks, L.M., Dellaglio, F., and Collins, M.D. (1995a). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. *45*, 395–397.

Dieterle, M.E., Bowman, C., Batthyany, C., Lanzarotti, E., Turjanski, A., Hatfull, G., and Piuri, M. (2014). Exposing the secrets of two well-known *Lactobacillus casei* phages, J-1 and PL-1, by genomic and structural analysis. Appl. Environ. Microbiol. *80*, 7107–7121.

Dieterle, M.-E., Spinelli, S., Sadovskaya, I., Piuri, M., and Cambillau, C. (2017). Evolved distal tail carbohydrate binding modules of *Lactobacillus* phage J-1: a novel type of anti-receptor widespread among lactic acid bacteria phages. Mol. Microbiol. *104*, 608–620.

Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., et al. (2014). Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. PloS One *9*, e98898.

Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O., Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., and Dols-Lafargue, M. (2016). Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization. Food Microbiol. *53*, 10–17.

Doria, F., Napoli, C., Costantini, A., Berta, G., Saiz, J.-C., and Garcia-Moruno, E. (2013). Development of a new method for detection and identification of *Oenococcus oeni* bacteriophages based on endolysin gene sequence and randomly amplified polymorphic DNA. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 4799–4805.

Douglas, L.J., and Wolin, M.J. (1971). Cell wall polymers and phage lysis of *Lactobacillus plantarum*. Biochemistry (Mosc.) *10*, 1551–1555.

Duckworth, D.H. (1976). Who discovered bacteriophage? Bacteriol. Rev. *40*, 793–802.

Dufour, N., and Debarbieux, L. (2017). Phage therapy: a realistic weapon against multidrug resistant bacteria. Med. Sci. MS *33*, 410–416.

Dufour, N., Debarbieux, L., Fromentin, M., and Ricard, J.-D. (2015). Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. Crit. Care Med. *43*, e190-198.

Duhaime, M.B., Solonenko, N., Roux, S., Verberkmoes, N.C., Wichels, A., and Sullivan, M.B. (2017). Comparative omics and trait analyses of marine *Pseudoalteromonas* phages advance the phage OTU concept. Front. Microbiol. *8*.

Edlund, A., Santiago-Rodriguez, T.M., Boehm, T.K., and Pride, D.T. (2015). Bacteriophage and their potential roles in the human oral cavity. J. Oral Microbiol. *7*, 27423.

Edwards, R.A., McNair, K., Faust, K., Raes, J., and Dutilh, B.E. (2016). Computational approaches to predict bacteriophage-host relationships. FEMS Microbiol. Rev. *40*, 258–272.

Ehrmann, M.A., Angelov, A., Picozzi, C., Foschino, R., and Vogel, R.F. (2013). The genome of the *Lactobacillus sanfranciscensis* temperate phage EV3. BMC Res. Notes *6*, 514.

El Khoury, M., Campbell-Sills, H., Salin, F., Guichoux, E., Claisse, O., and Lucas, P.M. (2017). Biogeography of *Oenococcus oeni* reveals distinctive but nonspecific populations in wine-producing regions. Appl. Environ. Microbiol. *83*.

Ellis, E.L., and Delbrück, 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.

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., et al. (2017). Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. Nature *541*, 488–493.

Farenc, C., Spinelli, S., Vinogradov, E., Tremblay, D., Blangy, S., Sadovskaya, I., Moineau, S., and Cambillau, C. (2014). Molecular insights on the recognition of a *Lactococcus lactis* cell wall pellicle by the phage 1358 receptor binding protein. J. Virol. *88*, 7005–7015.

Faruque, S.M., Asadulghani, null, Alim, A.R., Albert, M.J., Islam, K.M., and Mekalanos, J.J. (1998). Induction of the lysogenic phage encoding cholera toxin in naturally occurring strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. Infect. Immun. *66*, 3752–3757.

Favier, M. (2012). Etude des plasmides et génomes d'*Oenococcus oeni* pour l'identification des gènes d'intérêt technologique (Bordeaux 2).

Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., and Herskovits, A.A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 641–650.

Figueiredo, A.R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., and Couto, J.A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii.* Food Microbiol. *25*, 105–112.

Figueroa-Bossi, N., and Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. Mol. Microbiol. *33*, 167–176.

Firlieyanti, A.S., Connerton, P.L., and Connerton, I.F. (2016). Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. Int. J. Food Microbiol. *237*, 121–127.

Firrman, J., Liu, L., Zhang, L., Arango Argoty, G., Wang, M., Tomasula, P., Kobori, M., Pontious, S., and Xiao, W. (2016). The effect of quercetin on genetic expression of the commensal gut microbes *Bifidobacterium catenulatum, Enterococcus caccae and Ruminococcus gauvreauii.* Anaerobe *42*, 130–141.

Ford, M.E., Sarkis, G.J., Belanger, A.E., Hendrix, R.W., and Hatfull, G.F. (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., 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.

Frampton, R.A., Taylor, C., Holguín Moreno, A.V., Visnovsky, S.B., Petty, N.K., Pitman, A.R., and Fineran, P.C. (2014). Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae.* Appl. Environ. Microbiol. *80*, 2216–2228.

Franquès, J., Araque, I., Palahí, E., Portillo, M. del C., Reguant, C., and Bordons, A. (2017). Presence of *Oenococcus oeni* and other lactic acid bacteria in grapes and wines from Priorat (Catalonia, Spain). LWT - Food Sci. Technol. *81*, 326–334.

Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium.* Science *270*, 397–403.

Fugelsang, K.C. (1997). Fermentation and post-fermentation processing. In Wine Microbiology, (Springer, Boston, MA), pp. 132–142.

Gama, J.A., Reis, A.M., Domingues, I., Mendes-Soares, H., Matos, A.M., and Dionisio, F. (2013). Temperate bacterial viruses as double-edged swords in bacterial warfare. PLOS ONE *8*, e59043.

Garofalo, C., El Khoury, M., Lucas, P., Bely, M., Russo, P., Spano, G., and Capozzi, V. (2015). Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. J. Appl. Microbiol. *118*, 1395–1408.

Garvie, E.I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp.nov. J. Gen. Microbiol. *48*, 431–438.

Gerbaux, P., Barbieux-Flammang, M., Van Haverbeke, Y., and Flammang, R. (1999). Characterization of ionized heterocyclic carbenes by ion-molecule reactions. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM *13*, 1707–1711.

Ghiselli, null, Nardini, null, Baldi, null, and Scaccini, null (1998). Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. J. Agric. Food Chem. *46*, 361–367.

Ghosh, D., Roy, K., Williamson, K.E., Srinivasiah, S., Wommack, K.E., and Radosevich, M. (2009). Acyl-homoserine lactones can induce virus production in lysogenic bacteria: an alternative paradigm for prophage induction. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 7142–7152.

Giménez-Gómez, P., Gutiérrez-Capitán, M., Puig-Pujol, A., Capdevila, F., Muñoz, S., Tobeña, A., Miró, A., and Jiménez-Jorquera, C. (2017). Analysis of free and total sulfur dioxide in wine by using a gas-diffusion analytical system with pH detection. Food Chem. *228*, 518–525.

Gindreau, E., Torlois, S., and Lonvaud-Funel, A. (1997). Identification and sequence analysis of the region encoding the site-specific integration system from *Leuconostoc œnos* (*Œnococcus œni*) temperate bacteriophage ϕ10MC. FEMS Microbiol. Lett. *147*, 279–285.

Gnaegi, F., Cazelles, O., Sozzi, T., and D'Amico, N. (1984). Connaissances sur les bacteriophages de *Leuconostoc oenos* et progres dans la maitrise de la fermentation malolactique des vins. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.

Gopu, V., Meena, C.K., and Shetty, P.H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: in-vitro and in-silico evidence. PloS One *10*, e0134684.

Granato, D., Katayama, F.C.U., and Castro, I.A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. LWT - Food Sci. Technol. *43*, 1542–1549.

Grazziotin, A.L., Koonin, E.V., and Kristensen, D.M. (2017). Prokaryotic virus orthologous groups (pVOGs): a resource for comparative genomics and protein family annotation. Nucleic Acids Res. *45*, D491–D498.

Greer, G.G., Dilts, B.D., and Ackermann, H.-W. (2007). Characterization of a *Leuconostoc gelidum* bacteriophage from pork. Int. J. Food Microbiol. *114*, 370–375.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., and Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni.* Int. J. Food Microbiol. *105*, 233–244.

Grose, J.H., and Casjens, S.R. (2014). Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages that infect the bacterial family *Enterobacteriaceae*. Virology *468–470*, 421–443.

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.

Gutiérrez, D., Martín-Platero, A.M., 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.

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. Front. Microbiol. *7*, 825.

Guzzo, F., Cappello, M.S., Azzolini, M., Tosi, E., and Zapparoli, G. (2011). The inhibitory effects of wine phenolics on lysozyme activity against lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. *148*, 184–190.

Guzzo, J., Jobin, M.-P., and Diviès, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. FEMS Microbiol. Lett. *160*, 43–47.

Hagens, S., and Loessner, M.J. (2014). Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. Front. Microbiol. *5*, 159.

Hatfull, G.F., and Hendrix, R.W. (2011). Bacteriophages and their genomes. Curr. Opin. Virol. *1*, 298–303.

Hatfull, G.F., Cresawn, S.G., and Hendrix, R.W. (2008). Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. Res. Microbiol. *159*, 332–339.

Hatfull, G.F., Jacobs-Sera, D., Lawrence, J.G., Pope, W.H., Russell, D.A., Ko, C.-C., Weber, R.J., Patel, M.C., Germane, K.L., Edgar, R.H., et al. (2010). Comparative genomic analysis of 60

Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. J. Mol. Biol. *397*, 119–143.

Hayes, S., Mahony, J., Nauta, A., and van Sinderen, D. (2017). Metagenomic approaches to assess bacteriophages in various environmental niches. Viruses *9*.

Hendrix, R.W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. Theor. Popul. Biol. *61*, 471–480.

Hendrix, R.W. (2009). Jumbo bacteriophages. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *328*, 229–240.

Hendrix, R.W., Lawrence, J.G., Hatfull, G.F., and Casjens, S. (2000). The origins and ongoing evolution of viruses. Trends Microbiol. *8*, 504–508.

Henick-Kling, T., Lee, T.H., and Nicholas, D.J.D. (1986a). Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage. J. Appl. Bacteriol. *61*, 287–293.

Henick-Kling, T., Lee, T.H., and Nicholas, D.J.D. (1986b). Characterization of the lytic activity of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* isolated from wine. J. Appl. Bacteriol. *61*, 525–534.

Heyse, S., Hanna, L.F., Woolston, J., Sulakvelidze, A., and Charbonneau, D. (2015). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Salmonella* in dried pet food. J. Food Prot. *78*, 97–103.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal. Chem. *83*, 8604–8610.

Hirai, I., Okuno, M., Katsuma, R., Arita, N., Tachibana, M., and Yamamoto, Y. (2010). Characterisation of anti-*Staphylococcus aureus* activity of quercetin. Int. J. Food Sci. Technol. *45*, 1250–1254.

Ho, C.-H., Stanton-Cook, M., Beatson, S.A., Bansal, N., and Turner, M.S. (2016). Stability of active prophages in industrial *Lactococcus lactis* strains in the presence of heat, acid, osmotic, oxidative and antibiotic stressors. Int. J. Food Microbiol. *220*, 26–32.

Hobbs, Z., and Abedon, S.T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with “Lytic or lysogenic.” FEMS Microbiol. Lett. *363*.

Holmes, R.K., and Barksdale, L. (1969). Genetic analysis of tox+ and tox- bacteriophages of Corynebacterium diphtheriae. J. Virol. *3*, 586–598.

Hoos, G., and Blaich, R. (1990). Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola.* J. Phytopathol. *129*, 102–110.

Hooton, S.P.T., Brathwaite, K.J., and Connerton, I.F. (2016). The Bacteriophage carrier state of *Campylobacter jejuni* features changes in host non-coding RNAs and the acquisition of new host-derived CRISPR spacer sequences. Front. Microbiol. *7*, 355.

Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., and Sullivan, M.B. (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. ISME J. *11*, 1511–1520.

Huang, C.-M., Asmundson, R., and Kelly, W. (1996). Characterization of a temperate phage isolated from *Leuconostoc oenos* strain 1002. Appl. Microbiol. Biotechnol. *45*, 472–476.

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., and Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? Oxid. Med. Cell. Longev. *2016*, 7432797.

Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., and Svendsen, A.B. (1987). Antimicrobial activities of essential oils. Pharm. Weekbl. *9*, 193–197.

Jaomanjaka, F. (2014). Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins (Bordeaux).

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., Blanche-Barbat, M., Petrel, M., Ballestra, P., and Marrec, C.L. (2016). Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni.* Food Microbiol. *54*, 167–177.

Jassim, S.A.A., Limoges, R.G., and El-Cheikh, H. (2016). Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. World J. Microbiol. Biotechnol. *32*, 70.

Jones, L.M., McDUFF, C.R., and Wilson, J.B. (1962). Phenotypic alterations in the colonial morphology of *Brucella abortus* due to a bacteriophage carrier state. J. Bacteriol. *83*, 860–866.

Juhala, R.J., Ford, M.E., Duda, R.L., Youlton, A., Hatfull, G.F., and Hendrix, R.W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. J. Mol. Biol. *299*, 27–51.

Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 2264–2274.

Katsura, I., and Hendrix, R.W. (1984). Length determination in bacteriophage lambda tails. Cell *39*, 691–698.

Khoddami, A., Wilkes, M., and Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds.

Khoury, M.E. (2014). Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles. Université de Bordeaux.

Kim, T.G., Jeong, S.-Y., and Cho, K.-S. (2014). Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. *98*, 6105–6113.

Kim, Y., Van Bonn, W., Aw, T.G., and Rose, J.B. (2017). Aquarium viromes: viromes of human-managed aquatic systems. Front. Microbiol. *8*, 1231.

King, S.W., and Beelman, R.B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. Am. J. Enol. Vitic. *37*, 53–60.

Klančnik, A., Toplak, N., Kovač, M., Marquis, H., and Jeršek, B. (2015). Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. J. Microbiol. Methods *118*, 37–41.

Kleiner, M., Hooper, L.V., and Duerkop, B.A. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. BMC Genomics *16*, 7.

Kleppen, H.P., Holo, H., Jeon, S.-R., Nes, I.F., and Yoon, S.-S. (2012). Novel *Podoviridae* family bacteriophage infecting *Weissella cibaria* isolated from Kimchi. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 7299–7308.

Krieger-Weber, S. (2017). Application of yeast and bacteria as starter cultures. In biology of microorganisms on grapes, in must and in wine, (Springer, Cham), pp. 605–634.

Kropinski, A.M., Prangishvili, D., and Lavigne, R. (2009). Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. Environ. Microbiol. *11*, 2775–2777.

Krupovic, M., Dutilh, B.E., Adriaenssens, E.M., Wittmann, J., Vogensen, F.K., Sullivan, M.B., Rumnieks, J., Prangishvili, D., Lavigne, R., Kropinski, A.M., et al. (2016). Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. Arch. Virol. *161*, 1095–1099.

Kunkee, R.E. (1997). A heady concoction of alcoholic and malolactic fermentations. Nat. Biotechnol. *15*, 224–225.

Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 317–327.

Ladero, V., Gómez-Sordo, C., Sánchez-Llana, E., del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M.C., and Alvarez, M.A. (2016). Q69 (an *E. faecalis*-infecting bacteriophage) As a biocontrol agent for reducing tyramine in dairy products. Front. Microbiol. *7*.

Lasik, M. (2013). The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. Eur. Food Res. Technol. *237*, 843–850.

Lawrence, J.G., Hatfull, G.F., and Hendrix, R.W. (2002). Imbroglios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. J. Bacteriol. *184*, 4891–4905.

Lee, A. (1978). Bacteriophages associated with *lactobacilli* iso-lated from wine. In Proceedings of the 5th International Oenological symposium,13-15 February 1978, Auckland. p.287-295.

Lee, Y.-D., and Park, J.-H. (2016). Phage conversion for β-Lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from foods. J. Microbiol. Biotechnol. *26*, 263–269.

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, S., Kim, M.G., Lee, H.S., Heo, S., Kwon, M., and Kim, G. (2017). Isolation and characterization of *Listeria* phages for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. *37*, 320–328.

Lemay, M.-L., Tremblay, D.M., and Moineau, S. (2017). Genome engineering of virulent Lactococcal phages using CRISPR-Cas9. ACS Synth. Biol. *6*, 1351–1358.

Li, K., Barksdale, L., and Garmise, L. (1961). Phenotypic alterations associated with the bacteriophage carrier state of *Shigella dysenteriae*. J. Gen. Microbiol. *24*, 355–367.

Liu, M., Bischoff, K.M., Gill, J.J., Mire-Criscione, M.D., Berry, J.D., Young, R., and Summer, E.J. (2015). Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics disrupted by *Lactobacillus fermentum*. Biotechnol. Biofuels *8*, 132.

Liu, W., Li, C., Qiu, Z.-G., Jin, M., Wang, J.-F., Yang, D., Xiao, Z.-H., Yuan, Z.-K., Li, J.-W., Xu, Q.-Y., et al. (2017). Development of a novel and highly efficient method of isolating bacteriophages from water. J. Microbiol. Methods *139*, 143–149.

Löf, D., Schillén, K., Jönsson, B., and Evilevitch, A. (2007). Dynamic and static light scattering analysis of DNA ejection from the phage lambda. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. *76*, 011914.

Lombardi, S.J., Tremonte, P., Succi, M., Pannella, G., Luca, T., Sorrentino, E., R, C., and Iorizzo, M. (2012). Effect of phenolic compounds on the growth and L-malic acid metabolism of *Oenococcus oeni*. J. Life Sci. *6*, 1225–1231.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. In Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, (Springer), pp. 317–331.

Lonvaud-Funel, A., and Saad, A.M.S. de (1982). Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. Appl. Environ. Microbiol. *43*, 357–361.

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.

Lood, R., and Collin, M. (2011). Characterization and genome sequencing of two *Propionibacterium acnes* phages displaying pseudolysogeny. BMC Genomics *12*, 198.

Los, M., Wegrzyn, 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.

Lu, Z., Altermann, E., Breidt, F., and Kozyavkin, S. (2010). Sequence analysis of *Leuconostoc mesenteroides* bacteriophage Phi1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 1955–1966.

Lu, Z., Pérez-Díaz, I.M., Hayes, J.S., and Breidt, F. (2012). Bacteriophage ecology in a commercial cucumber fermentation. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 8571–8578.

Lucchini, S., Desiere, F., and Brüssow, H. (1999). Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. J. Virol. *73*, 8647–8656.

Lwoff, A. (1953). Lysogeny. Bacteriol. Rev. *17*, 269–337.

Ly, M., Jones, M.B., Abeles, S.R., Santiago-Rodriguez, T.M., Gao, J., Chan, I.C., Ghose, C., and Pride, D.T. (2016). Transmission of viruses via our microbiomes. Microbiome *4*, 64.

Mahony, J., and van Sinderen, D. (2015). Gram-positive phage-host interactions. Front. Microbiol. *6*, 61.

Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E., and van Sinderen, D. (2016). Phage-host interactions of cheese-making Lactic Acid Bacteria. Annu. Rev. Food Sci. Technol. *7*, 267–285.

Mahony, J., Oliveira, J., Collins, B., Hanemaaijer, L., Lugli, G.A., Neve, H., Ventura, M., Kouwen, T.R., Cambillau, C., and van Sinderen, D. (2017). Genetic and functional characterisation of the lactococcal P335 phage-host interactions. BMC Genomics *18*, 146.

Makra, I., Terejánszky, P., and Gyurcsányi, R.E. (2015). A method based on light scattering to estimate the concentration of virus particles without the need for virus particle standards. MethodsX *2*, 91–99.

Mallmann, W.L., and Hemstreet, C.J. (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. Agric Res *28*, 599–602.

Manchester, L. n. (1997). Characterization of a bacteriophage for *Carnobacterium divergens* NCFB 2763 by host specificity and electron microscopy. Lett. Appl. Microbiol. *25*, 401–404.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. *13*, 614–629.

Marcobal, A.M., Sela, D.A., Wolf, Y.I., Makarova, K.S., and Mills, D.A. (2008). Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. J. Bacteriol. *190*, 564–570.

Marques, A.P., Duarte, A.J., Chambel, L., Teixeira, M.F., San Romão, M.V., and Tenreiro, R. (2011). Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol. *14*, 155–162.

Marrec, C.L., 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.

Martinez-Murcia, A.J., Harland, N.M., and Collins, M.D. (1993). Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. J. Appl. Bacteriol. *74*, 532–541.

Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., and Masneuf-Pomarède, I. (2012). Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system. Int. J. Food Microbiol. *158*, 93–100.

Maszewska, A., Wójcik, E., Ciurzyńska, A., Wojtasik, A., Piątkowska, I., Dastych, J., and Różalski, A. (2016). Differentiation of polyvalent bacteriophages specific to uropathogenic *Proteus mirabilis* strains based on the host range pattern and RFLP. Acta Biochim. Pol. *63*, 303–310.

Mc Grath, S., Fitzgerald, G.F., and van Sinderen, D. (2007). Bacteriophages in dairy products: Pros and cons. Biotechnol. J. *2*, 450–455.

McCabe, O., Spinelli, S., Farenc, C., Labbé, M., Tremblay, D., Blangy, S., Oscarson, S., Moineau, S., and Cambillau, C. (2015). The targeted recognition of *Lactococcus lactis* phages to their polysaccharide receptors. Mol. Microbiol. *96*, 875–886.

McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J.-P., Kouwen, T., and van Sinderen, D. (2016). Identification and Analysis of a Novel Group of Bacteriophages Infecting the Lactic Acid Bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. *82*, 5153–5165.

McRae, J.M., Schulkin, A., Kassara, S., Holt, H.E., and Smith, P.A. (2013). Sensory Properties of Wine Tannin Fractions: Implications for In-Mouth Sensory Properties. J. Agric. Food Chem. *61*, 719–727.

Meier-Kolthoff, J.P., and Göker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. Bioinforma. Oxf. Engl. *33*, 3396–3404.

Menouni, R., Hutinet, G., Petit, M.-A., and Ansaldi, M. (2015). Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination. FEMS Microbiol. Lett. *362*, 1–10.

Merrill, B.D., Ward, A.T., Grose, J.H., and Hope, S. (2016). Software-based analysis of bacteriophage genomes, physical ends, and packaging strategies. BMC Genomics *17*, 679.

Miernikiewicz, P., Dąbrowska, K., Piotrowicz, A., Owczarek, B., Wojas-Turek, J., Kicielińska, J., Rossowska, J., Pajtasz-Piasecka, E., Hodyra, K., Macegoniuk, K., et al. (2013). T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. PloS One *8*, e71036.

Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. *30*, 136–141.

Mills, D.A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., and Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. FEMS Microbiol. Rev. *29*, 465–475.

Mirzaei, M.K., and Maurice, C.F. (2017). Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. Nat. Rev. Microbiol. *15*, 397–408.

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.

Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., and Queipo-Ortuño, M.I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. Food Funct. *7*, 1775–1787.

Morenzoni, R. (1974). The Enzymology of Malo-Lactic Fermentation. In Chemistry of Winemaking, (American Chemical Society), pp. 171–183.

Muhammed, M.K., Krych, L., Nielsen, D.S., and Vogensen, F.K. (2017a). A high-throughput qPCR system for simultaneous quantitative detection of dairy *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* bacteriophages. PloS One *12*, e0174223.

Muhammed, M.K., Kot, W., Neve, H., Mahony, J., Castro-Mejía, J.L., Krych, L., Hansen, L.H., Nielsen, D.S., Sørensen, S.J., Heller, K.J., et al. (2017b). Metagenomic analysis of dairy bacteriophages: extraction method and pilot study on whey samples derived from using undefined and defined mesophilic starter cultures. Appl. Environ. Microbiol.

Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Martínez-Cachá, A., and Barba, A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. Food Chem. *180*, 25–31.

Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V., and Rivas, B. de las (2011). Chapter 8 - Lactic Acid Bacteria. In Molecular Wine Microbiology, (San Diego: Academic Press), pp. 191–226.

Nanda, A.M., Thormann, K., and Frunzke, J. (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. J. Bacteriol. *197*, 410–419.

Nascimento, J.G., Guerreiro-Pereira, M.C., Costa, S.F., São-José, C., and Santos, M.A. (2008). Nisin-triggered activity of Lys44, the secreted endolysin from *Oenococcus oeni* Phage fOg44. J. Bacteriol. *190*, 457–461.

Nel, L., Wingfield, B.D., Van der Meer, L.J., and Van Vuuren, H.J.J. (1987). Isolation and characterization of *Leuconostoc oenos* bacteriophages from wine and sugarcane. FEMS Microbiol. Lett. *44*, 63–67.

Nelson, D. (2004). Phage taxonomy: we agree to disagree. J. Bacteriol. *186*, 7029–7031.

Nikiforov, V.N., Vinogradov, S.E., Ivanov, A.V., Efremova, E.V., Kalnina, L.B., Bychenko, A.B., Tentsov, Y.Y., and Manykin, A.A. (2016). Application of laser correlation spectroscopy for measuring virus size. Bull. Exp. Biol. Med. *161*, 88–91.

Okabe, N., and Goto, M. (2003). Bacteriophages of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. *1*, 397–418.

Oliveira, J., Mahony, J., Hanemaaijer, L., Kouwen, T.R.H.M., Neve, H., MacSharry, J., and van Sinderen, D. (2017). Detecting *Lactococcus lactis* prophages by Mitomycin C-mediated induction coupled to flow cytometry analysis. Front. Microbiol. *8*, 1343.

Osborne, J. p., Dubé Morneau, A., and Mira de Orduña, R. (2006). Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. J. Appl. Microbiol. *101*, 474–479.

Otsuka, N., Liu, M.-H., Shiota, S., Ogawa, W., Kuroda, T., Hatano, T., and Tsuchiya, T. (2008). Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. Biol. Pharm. Bull. *31*, 1794–1797.

Park, E.-J., Kim, K.-H., Abell, G.C.J., Kim, M.-S., Roh, S.W., and Bae, J.-W. (2011). Metagenomic analysis of the viral communities in fermented foods. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 1284–1291.

Parreira, R., São-José, C., Isidro, A., Domingues, S., Vieira, G., and Santos, M.A. (1999). Gene organization in a central DNA fragment of *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 encoding lytic, integrative and non-essential functions. Gene *226*, 83–93.

Pietracha, D., and Misiewicz, A. (2016). Use of products a phage in food industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food (*Listeria monocytogenes* phages in food industry) - a Review. Czech J. Food Sci. *34*, 1–8.

Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R., Sillankorva, S., and Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. *100*, 2141–2151.

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.

Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., and Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). Int. J. Food Microbiol. *219*, 56–63.

Pourcel, C., Midoux, C., Vergnaud, G., and Latino, L. (2017). A carrier state is established in *Pseudomonas aeruginosa* by phage LeviOr01, a newly isolated ssRNA *levivirus*. J. Gen. Virol. *98*, 2181–2189.

Prangishvili, D. (2013). The wonderful world of archaeal viruses. Annu. Rev. Microbiol. *67*, 565–585.

Prangishvili, D., Forterre, P., and Garrett, R.A. (2006). Viruses of the archaea: a unifying view. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 837–848.

Pride, D.T., Wassenaar, T.M., Ghose, C., and Blaser, M.J. (2006a). Evidence of host-virus co-evolution in tetranucleotide usage patterns of bacteriophages and eukaryotic viruses. BMC Genomics *7*, 8.

Proux, C., van Sinderen, D., Suarez, J., Garcia, P., Ladero, V., Fitzgerald, G.F., 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.

Pujato, S.A., Mercanti, D.J., Guglielmotti, D.M., Rousseau, G.M., Moineau, S., Reinheimer, J.A., and Quiberoni, A. del L. (2015). Phages of dairy *Leuconostoc mesenteroides*: genomics and factors influencing their adsorption. Int. J. Food Microbiol. *201*, 58–65.

Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Martínez-García, M., Quiberoni, A., and Mojica, F.J.M. (2017). *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages: Genomics and cross-species host ranges. Int. J. Food Microbiol. *257*, 128–137.

Quiberoni, A., Stiefel, J.I., and Reinheimer, J.A. (2000). Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol. J. Appl. Microbiol. *89*, 1059–1065.

Reddy, P.P. (2012). Bacteriophages. In Recent Advances in Crop Protection, (Springer, New Delhi), pp. 25–36.

Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., and Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. J. Appl. Microbiol. *88*, 1065–1071.

Ribéreau-Gayon, P., and Dubourdieu, D. (1998). Traité d'oenologie (Dunod).

Ricagno, S., Campanacci, V., Blangy, S., Spinelli, S., Tremblay, D., Moineau, S., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2006). Crystal structure of the receptor-binding protein head domain from *Lactococcus lactis* phage bIL170. J. Virol. *80*, 9331–9335.

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., and Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinforma. Oxf. Engl. *32*, 929–931.

Rihtman, B., Meaden, S., Clokie, M.R.J., Koskella, B., and Millard, A.D. (2016). Assessing Illumina technology for the high-throughput sequencing of bacteriophage genomes. PeerJ *4*, e2055.

Ríos, J.L., and Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. *100*, 80–84.

Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., and Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. *132*, 79–90.

Rohwer, F., and Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. J. Bacteriol. *184*, 4529–4535.

Rossmann, F.S., Racek, T., Wobser, D., Puchalka, J., Rabener, E.M., Reiger, M., Hendrickx, A.P.A., Diederich, A.-K., Jung, K., Klein, C., et al. (2015). Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing. PLoS Pathog. *11*, e1004653.

Rozès, N., Arola, L., and Bordons, A. (2003). Effect of phenolic compounds on the co-metabolism of citric acid and sugars by *Oenococcus oeni* from wine. Lett. Appl. Microbiol. *36*, 337–341.

Said, I.H., Shah, R.L., Ullrich, M.S., and Kuhnert, N. (2016). Quantification of microbial uptake of quercetin and its derivatives using an UHPLC-ESI-QTOF mass spectrometry assay. Food Funct. *7*, 4082–4091.

Salou, P., Loubiere, P., and Pareilleux, A. (1994). Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. Appl. Environ. Microbiol. *60*, 1459–1466.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (CSHL Press).

Samson, J.E., 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, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature *265*, 687–695.

Santos, R., Vieira, G., Santos, M. a., and Paveia, H. (1996a). 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.

São-José, C., Parreira, R., Vieira, G., and Santos, M.A. (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, A.G., Parreira, R., and Santos, M.A. (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.

Sciara, G., Bebeacua, C., Bron, P., Tremblay, D., Ortiz-Lombardia, M., Lichière, 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. U. S. A. *107*, 6852–6857.

Seo, H.S., Xiong, Y.Q., Mitchell, J., Seepersaud, R., Bayer, A.S., and Sullam, P.M. (2010). Bacteriophage lysin mediates the binding of *Streptococcus mitis* to human platelets through interaction with fibrinogen. PLOS Pathog. *6*, e1001047.

Seppänen, S.-K., Syrjälä, L., von Weissenberg, K., Teeri, T., Paajanen, L., and Pappinen, A. (2004). Antifungal activity of stilbenes in vitro bioassays and in transgenic Populus expressing a gene encoding pinosylvin synthase. Plant Cell Rep. *22*, 584–593.

Shan, J., Korbsrisate, S., Withatanung, P., Adler, N.L., Clokie, M.R.J., and Galyov, E.E. (2014). Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. Front. Microbiol. *5*, 599.

Shen, Y., Köller, T., Kreikemeyer, B., and Nelson, D.C. (2013). Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. J. Antimicrob. Chemother. *68*, 1818–1824.

Shiba, S., Terawaki, A., Taguchi, T., and Kawamata, J. (1959). Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by mitomycin C. Nature *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.

Simmonds, P., Adams, M.J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J.R., Carstens, E.B., Davison, A.J., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., et al. (2017). Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. Nat. Rev. Microbiol. *15*, 161–168.

Simon, Martha N., Ronald W. Davis, and Norman Davidson 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, p.

Siranosian, B., Herold, E., Williams, E., Ye, C., and de Graffenried, C. (2015). Tetranucleotide usage in mycobacteriophage genomes: alignment-free methods to cluster phage and infer evolutionary relationships. BMC Bioinformatics *16*, A7.

Siringan, P., Connerton, P.L., Cummings, N.J., and Connerton, I.F. (2014). Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. Open Biol. *4*, 130200.

Smith, K.C., Castro-Nallar, E., Fisher, J.N., Breakwell, D.P., Grose, J.H., and Burnett, S.H. (2013). Phage cluster relationships identified through single gene analysis. BMC Genomics *14*, 410.

Sozzi, T., Maret, R., and Poulin, J.M. (1976). Mise en évidence de bactériophages dans le vin observation of bacteriophages in wine. Experientia *32*, 568–569.

Sozzi, T., Gnaegi, F., D'Amico, N., and Hose, H. (1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. Rev Suisse Vitic Arbor Hort *14*, 17–23.

Spano, G., and Massa, S. (2006). Environmental stress response in wine Lactic Acid Bacteria: beyond *Bacillus subtilis.* Crit. Rev. Microbiol. *32*, 77–86.

Spinelli, S., Veesler, D., Bebeacua, C., and Cambillau, C. (2014). Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. Front. Microbiol. *5*, 3.

Stalin, N., and Srinivasan, P. (2017). Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. Vet. Microbiol. *207*, 83–96.

Stefanaki, C., Peppa, M., Mastorakos, G., and Chrousos, G.P. (2017). Examining the gut bacteriome, virome, and mycobiome in glucose metabolism disorders: Are we on the right track? Metabolism. *73*, 52–66.

Stern, A., and Sorek, R. (2011). The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. BioEssays *33*, 43–51.

Sternes, P.R., and Borneman, A.R. (2016). Consensus pan-genome assembly of the specialised wine bacterium *Oenococcus oeni*. BMC Genomics *17*, 308.

Stivala, M.G., Villecco, M.B., Fanzone, M., Jofré, V., Rodríguez- Vaquero, M.J., and Aredes-Fernández, P. (2014). Characterization, antibacterial and biological activities of phenolic fraction of Argentinean red wines. Open Conf. Proc. J. *5*.

Strange, R.N., and Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. Annu. Rev. Phytopathol. *43*, 83–116.

Sullivan, M.B., Coleman, M.L., Quinlivan, V., Rosenkrantz, J.E., Defrancesco, A.S., Tan, G., Fu, R., Lee, J.A., Waterbury, J.B., Bielawski, J.P., et al. (2008). Portal protein diversity and phage ecology. Environ. Microbiol. *10*, 2810–2823.

Sun, S.Y., Gong, H.S., Liu, W.L., and Jin, C.W. (2016). Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines. Food Microbiol. *55*, 16–24.

Szymczak, P., Janzen, T., Neves, A.R., Kot, W., Hansen, L.H., Lametsch, R., Neve, H., Franz, C.M.A.P., and Vogensen, F.K. (2017). Novel variants of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages are indicative of genetic recombination among phages from different bacterial species. Appl. Environ. Microbiol. *83*, e02748-16.

Teeling, H., Waldmann, J., Lombardot, T., Bauer, M., and Glöckner, F.O. (2004). TETRA: a web-service and a stand-alone program for the analysis and comparison of tetranucleotide usage patterns in DNA sequences. BMC Bioinformatics *5*, 163.

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.

Thiéry, J-P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie *6*, 987-1018.

Toit, M. du, Engelbrecht, L., Lerm, E., and Krieger-Weber, S. (2011). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. Food Bioprocess Technol. *4*, 876–906.

Tomat, D., Mercanti, D., Balagué, C., and Quiberoni, A. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. Lett. Appl. Microbiol. *57*, 3–10.

Torres-Barceló, C., Franzon, B., Vasse, M., and Hochberg, M.E. (2016). Long-term effects of single and combined introductions of antibiotics and bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa*. Evol. Appl. *9*, 583–595.

Torriani, S., Felis, G.E., and Fracchetti, F. (2011). Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. Ann. Microbiol. *61*, 33–39.

Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L.C., Guzzo, J., Lee, B., and Diviès, C. (1999). Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni:* a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. FEMS Microbiol. Lett. *178*, 319–326.

Tremblay, D.M., Tegoni, M., Spinelli, S., Campanacci, V., Blangy, S., Huyghe, C., Desmyter, A., Labrie, S., Moineau, S., and Cambillau, C. (2006). Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. J. Bacteriol. *188*, 2400–2410.

Valyasevi, R., Sandine, W.E., and Geller, B.L. (1991). A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. J. Bacteriol. *173*, 6095–6100.

Van, L.M., and Saavedra, M.D.B. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? PLoS Genet. *5*, e1000437–e1000437.

Veesler, D., and Cambillau, C. (2011). A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *75*, 423–433, first page of table of contents.

Veesler, D., Spinelli, S., Mahony, J., Lichière, J., Blangy, S., Bricogne, G., Legrand, P., Ortiz-Lombardia, M., Campanacci, V., van Sinderen, D., et al. (2012). Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 8954–8958.

Vian, M.A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P.O., and Lacombe, J.M. (2005). Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. J. Chromatogr. A *1085*, 224–229.

Vilaça, R., Mendes, V., Mendes, M.V., Carreto, L., Amorim, M.A., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., and Costa, V. (2012). Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. PloS One *7*, e45494.

Villarroel, J., Kleinheinz, K.A., Jurtz, V.I., Zschach, H., Lund, O., Nielsen, M., and Larsen, M.V. (2016). HostPhinder: A phage host prediction tool. Viruses *8*.

Vivas, N., Lonvaud-Funel, A., and Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. Food Microbiol. *14*, 291–299.

Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C.M.A.P., Neve, H., and Heller, K.J. (2017). Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. Int. J. Food Microbiol. *241*, 308–317.

Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S.H., Pokusaeva, K., Sturino, J.M., and Wood, T.K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. Nat. Commun. *1*, 147.

Wilkinson, M.H. (2001). Predation in the presence of decoys: an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems. J. Theor. Biol. *208*, 27–36.

Winter, C., Bouvier, T., Weinbauer, M.G., and Thingstad, T.F. (2010). Trade-offs between competition and defense specialists among unicellular planktonic organisms: the “Killing the Winner” hypothesis revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *74*, 42–57.

Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *64*, 69–114.

Worley-Morse, T.O., Deshusses, M.A., and Gunsch, C.K. (2015). Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages. Biotechnol. Bioeng. *112*, 1544–1553.

Xiang, Y., Leiman, P.G., Li, L., Grimes, S., Anderson, D.L., and Rossmann, M.G. (2009). Crystallographic insights into the autocatalytic assembly mechanism of a bacteriophage tail spike. Mol. Cell *34*, 375–386.

Xu, Y., Liu, Y., Liu, Y., Pei, J., Yao, S., and Cheng, C. (2015). Bacteriophage therapy against *Enterobacteriaceae*. Virol. Sin. *30*, 11–18.

Yuan, Y., and Gao, M. (2017). Jumbo Bacteriophages: An Overview. Front. Microbiol. *8*, 403.

Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., and Górski, A. (2015). Phages in the global fruit and vegetable industry. J. Appl. Microbiol. *118*, 537–556.

Zago, M., Scaltriti, E., Fornasari, M.E., Rivetti, C., Grolli, S., Giraffa, G., Ramoni, R., and Carminati, D. (2012). Epifluorescence and atomic force microscopy: Two innovative applications for studying phage-host interactions in *Lactobacillus helveticus*. J. Microbiol. Methods *88*, 41–46.

Zago, M., Bonvini, B., Rossetti, L., Meucci, A., Giraffa, G., and Carminati, D. (2015). Biodiversity of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages isolated from cheese whey starters. J. Dairy Res. *82*, 242–247.

Zerbino, D.R., and Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. *18*, 821–829.

Zé-Zé, L., Tenreiro, R., Brito, L., Santos, M.A., and Paveia, H. (1998). Physical map of the genome of *Oenococcus oeni* PSU-1 and localization of genetic markers. Microbiology *144*, 1145–1156.

Zé-Zé, L., Chelo, I.M., and Tenreiro, R. (2008). Genome organization in *Oenococcus oeni* strains studied by comparison of physical and genetic maps. Int. Microbiol. *11*, 237.

Zinno, P., Janzen, T., Bennedsen, M., Ercolini, D., and Mauriello, G. (2010). Characterization of *Streptococcus thermophilus* lytic bacteriophages from mozzarella cheese plants. Int. J. Food Microbiol. *138*, 137–144.

Communications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture

Philippe C, Jaomanjaka F, Claisse O, Laforgue R, Maupeu J, Petrel M, and Le Marrec C (2017) A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int J Food Microbiol* **257**:138-147.

Philippe C, Krupovic M, Jaomanjaka F, Claisse O, Petrel M And Le Marrec C (soumis) Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting *Gluconobacter cerinus,* an acetic acid bacterium associated with wine-making. *Viruses*

Communications orales

Philippe C, Cluzet S, Jaomanjaka F, Claire O, Le Marrec C. Interactions between *Oenococcus oeni* and its cognate bacteriophages are modified in the presence of phenolic compounds au *Young Scientist Symposium 2017* à Pessac le 18 et 19 mai.

Philippe C, Cluzet S, Jaomanjaka F, Claire O, Ballestra P., Decendit A., Renouf E., Le Marrec C. Phage predation of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* in the presence of wine phenolic compounds. *2. French Phage Network,* le 21 et 22 novembre 2016*,* Marseille, France.

Communications affichées

Philippe C., Jaomanjaka F., Claisse O., Laforgue R., Maupeu J., Le Marrec C. (2016). Bacteriophages during wine making: revisiting an old problem with new tools. In *4. Virus of Microbes 2016-07-18/22, Liverpool, UK*

Philippe C., Jaomanjaka F., Claisse O., Ballestra P., Cluzet S., Le Marrec C. (2016). Effect of wine phenolic compounds on the lytic activity of oenophages. In *4. Virus of Microbes 2016-07-18/22, Liverpool, UK*

Philippe C., Jaomanjaka F., Claisse O., Laforgue R., Maupeu J., Le Marrec C. (2015). Characterization of oenophages isolated from different types of wine. In *10.* International Symposium of Oenology*, Bordeaux, France.*

Annexes

Annexe I. Recherche de corrélation entre les populations bactériennes et phagiques au cours du millésime 2015. I

Annexe II. Dynamiques des populations au cours du millésime 2015 II

Annexe III. Phages isolés au cours du millésime 2014 (n=72). IV

Annexe IV. Phages isolés au cours du millésime 2015 (n=65). V

Annexe V. Valeurs d'ANIb entre les oenophages (A) selon le pourcentage de couverture des génomes comparés (B). Les calculs ont été réalisés grâce à Jspecies. VI

Annexe VI. Impact de l'acide *p*-coumarique (APC, 1) et de la myricétine (2) sur le développement lytique des phages OE33PA et unk67.1 VII

Annexe VII. Utilisation de la Digital Droplet PCR pour évaluer la stabilité des prophages..... VIII

Annexe I. Recherche de corrélation entre les populations bactériennes et phagiques au cours du millésime 2015.

Tableau I. Matrice de corrélation (Test de corrélation de Pearson, XLstat).

Variables	Dénombrement BL (UFC/ml)	Phages actifs (Protocole 1)	Phages actifs (Protocole 2)	Cépage	TAV	GF+5	pH	AMal	ALac	IPT	D
Dénombrement BL (UFC/ml)	**1**	0,174	0,131	0,089	0,087	0,010	0,022	-0,186	**0,274**	0,042	0,009
Phages actifs (Protocole 1)	0,174	**1**	0,061	0,172	-0,098	-0,209	-0,132	-0,104	-0,168	-0,114	-0,074
Phages actifs (Protocole 2)	0,131	0,061	**1**	-0,046	-0,099	-0,043	-0,011	-0,178	-0,172	-0,031	-0,028
Cépage	0,089	0,172	-0,046	**1**	-0,159	-0,057	**-0,314**	-0,213	-0,127	-0,166	**-0,280**
TAV	0,087	0,098	-0,099	-0,159	**1**	-0,030	-0,077	-0,186	-0,167	-0,227	-0,035
GF+5	0,010	0,209	-0,043	0,057	-0,030	**1**	-0,118	-0,215	-0,127	-0,041	-0,088
pH	0,022	0,132	-0,011	**-0,314**	-0,077	-0,118	**1**	-0,064	**-0,299**	**-0,613**	**-0,906**
AMal	-0,186	-0,104	-0,178	0,213	0,186	0,215	0,064	**1**	**-0,733**	**-0,341**	-0,113
ALac	**0,274**	0,168	0,172	-0,127	-0,167	-0,127	**-0,299**	**-0,733**	**1**	**-0,293**	-0,144
IPT	0,042	0,114	-0,031	-0,166	-0,227	-0,041	**-0,613**	**-0,341**	**-0,293**	**1**	**-0,346**
D	0,009	0,074	0,028	**-0,280**	-0,035	-0,088	**-0,906**	-0,113	-0,144	**-0,346**	**1**

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

Annexe II. Dynamiques des populations au cours du millésime 2015

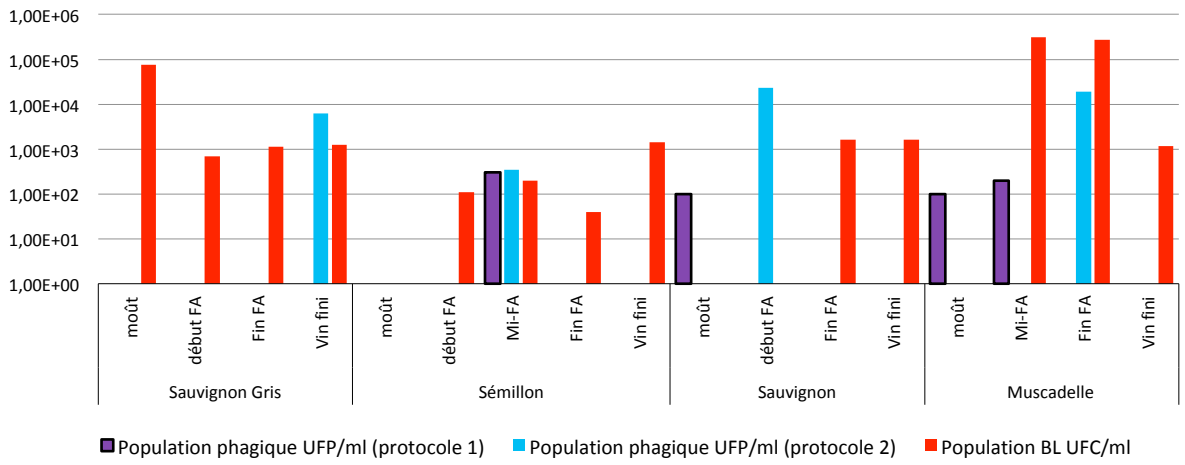


Figure 1. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château I (vins blancs).

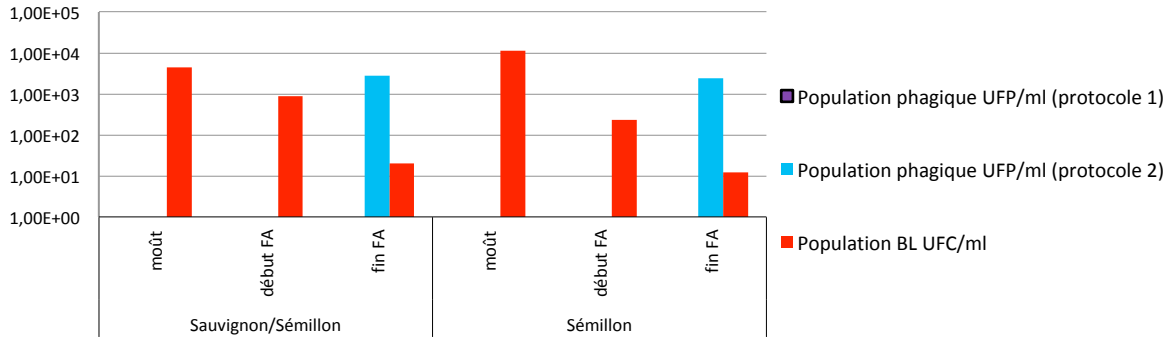


Figure 2. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château II (vins blancs).

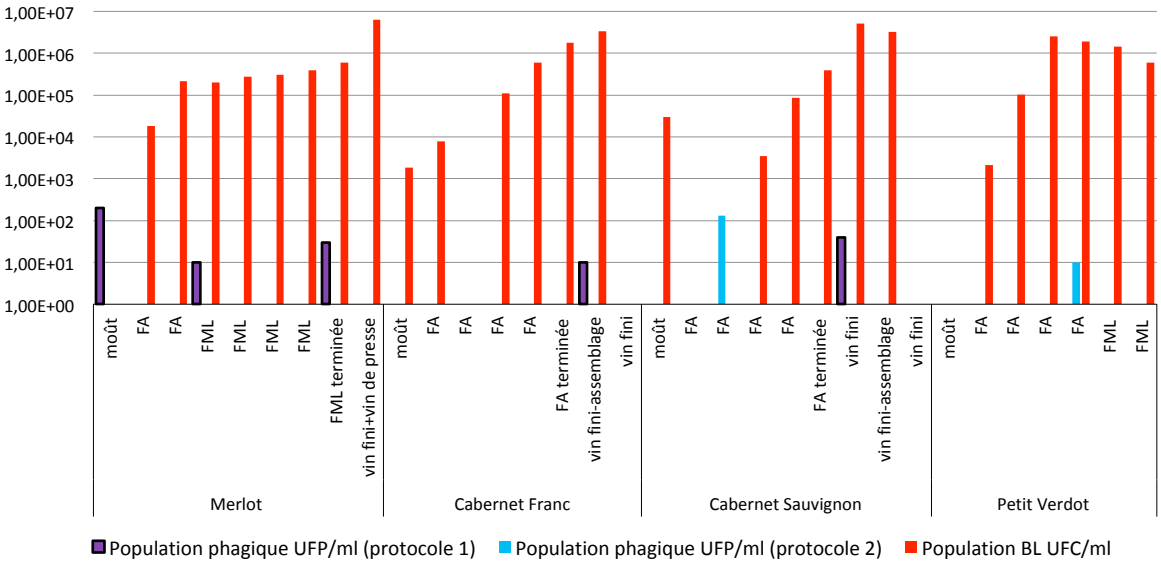


Figure 3. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château I (vins rouges).

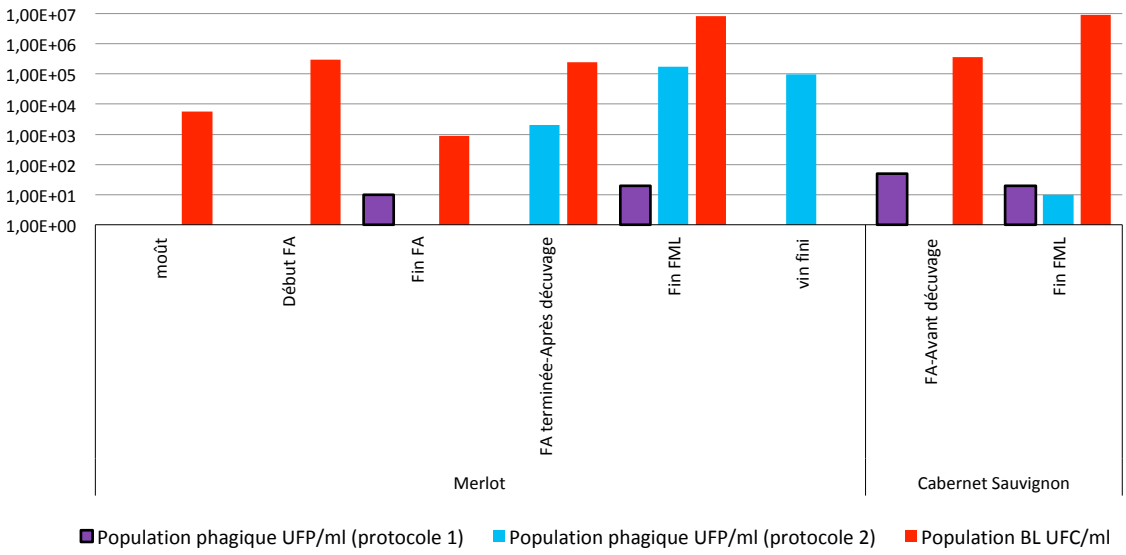


Figure 4. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château II (vins rouges).

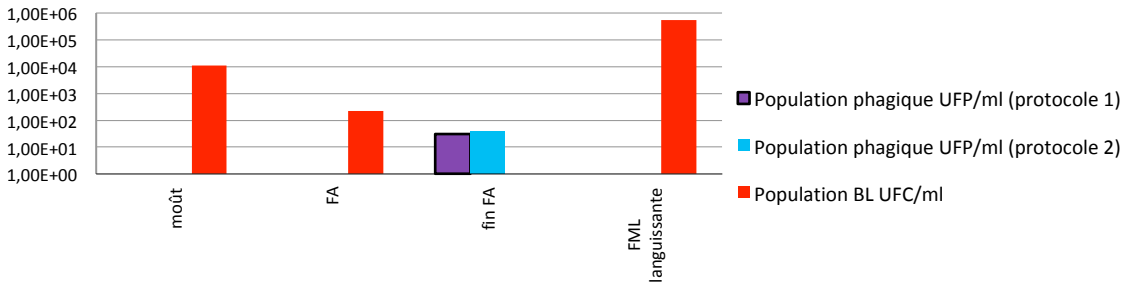


Figure 5. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château V (vin rouge).

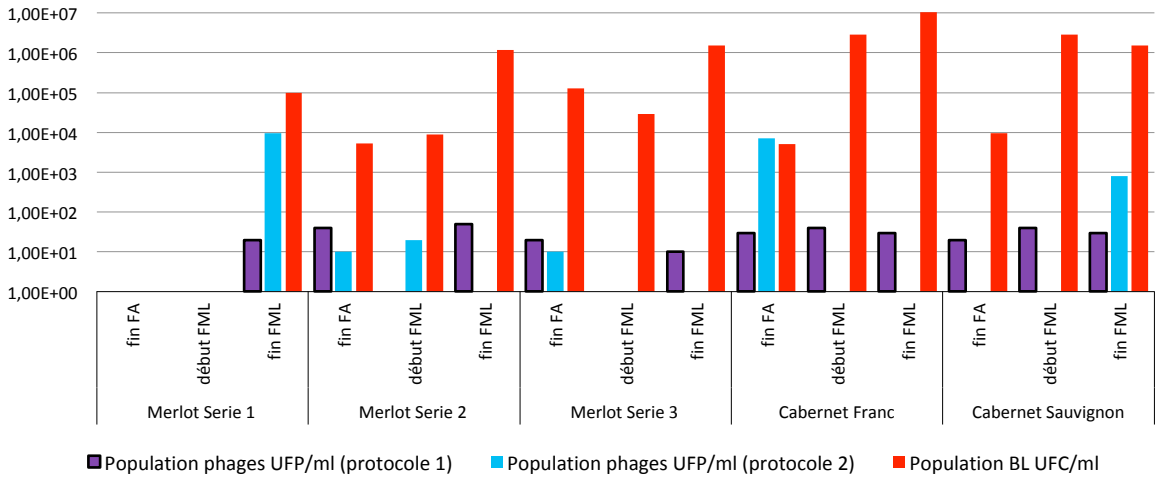


Figure 6. Dénombrement des populations bactériennes et phagiques des échantillons du château VI (vins rouges).

Annexe III. Phages isolés au cours du millésime 2014 (n=72).

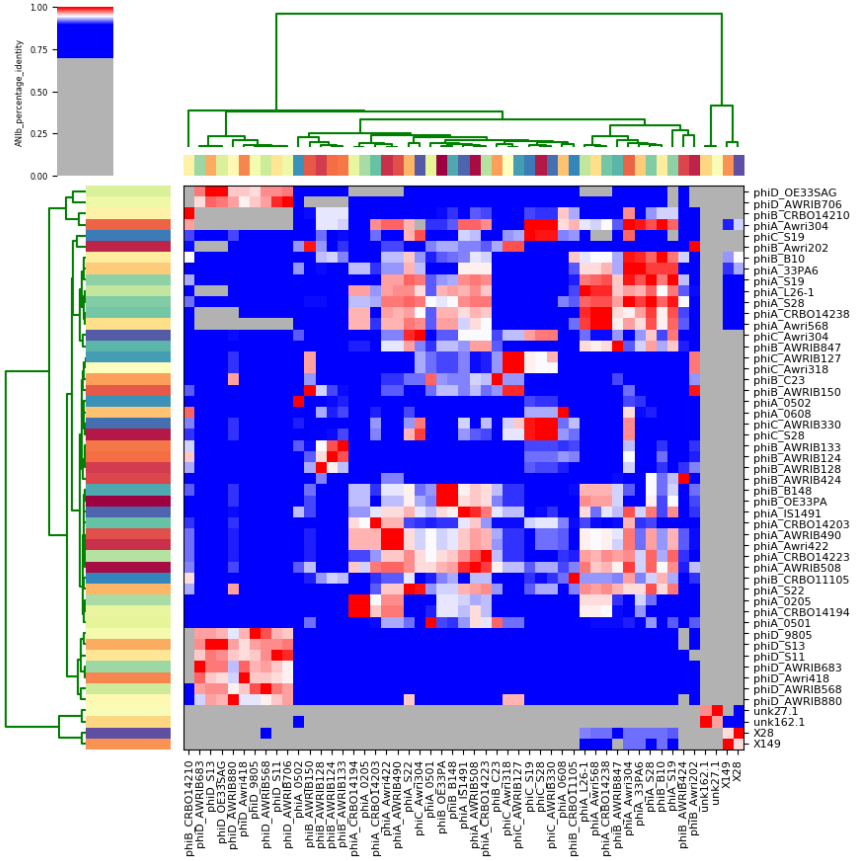
N° éch	Type de vin	Appellation-Cépage	Château	Stade	oenophages				
					A	B	C	D	Non-ABCD
67	Liq.								unk67.1
									unk67.2
68									unk68.1
									unk69.1a
69		Sauternes - Sémillon	I	moût					unk69.1b
									unk69.2
									unk70.1a
70									unk70.1b
									unk70.2
137		Sauternes-SauvBlanc	na						unk137.1
164								D164.1	
162		Sauternes-Sémillon/Muscatelle	P						unk162.1
165		Sauternes-Sémillon	R					D165.1	
125	Rouge	Saint-Emilion-CabFranc	na		A125.1 A125.2a A125.2b A125.2c				
166		Bordeaux-Merlot	S		A166.2				
2	Blanc	Bordeaux-SauvBlanc	K	Jus pour PDC				D2.2a ; D2.2b	
12		Bordeaux-Sémillon	N	PDC					unk12.1a unk12.1b
135	Rouge	Bordeaux - Merlot	C	FML	A135.2				
143		Pomerol - CabSauv	H		A143.2				
148		Gers-Gamay	na		A148.2a A148.2b	B148.2a B148.2b			
149		Gers-Merlot	na			B149.2	C149.2* X149		
150		Médoc-CabSauv/Merlot	na						unk150.2
151					A151.1 A151.2				unk151.1
152					A152.1				
153					A153.1a A153.1b				unk153.1 unk153.2
154					A154.1a A1541b				
155					A155.2a A155.2b				unk155.1
156					A156.2				unk156.1
157					A157.1.			D157.1	unk157.1
158									unk158.1 unk158.2
160					A160.1a A160.1b				unk160.1
163		Bordeaux-Carménère	Q		A163.1				
131		Saint-Emilion-CabSauv	na	FA	A131.1 A131.2a A131.2b				unk131.1 unk131.2
130		Pauillac-CabSauv/Merlot	na		A130.1				unk130.1
107				Elevage					unk107.1a unk107.1b
127		Saint-Emilion-CabSauv/Merlot	na	Bouteille (2000)	A127.1			D127.1	unk127.1
128				Bouteille (2011)	A128.1				unk128.1
129				Bouteille (2012)	A129.1				unk129.1

Annexe IV. Phages isolés au cours du millésime 2015 (n=65).

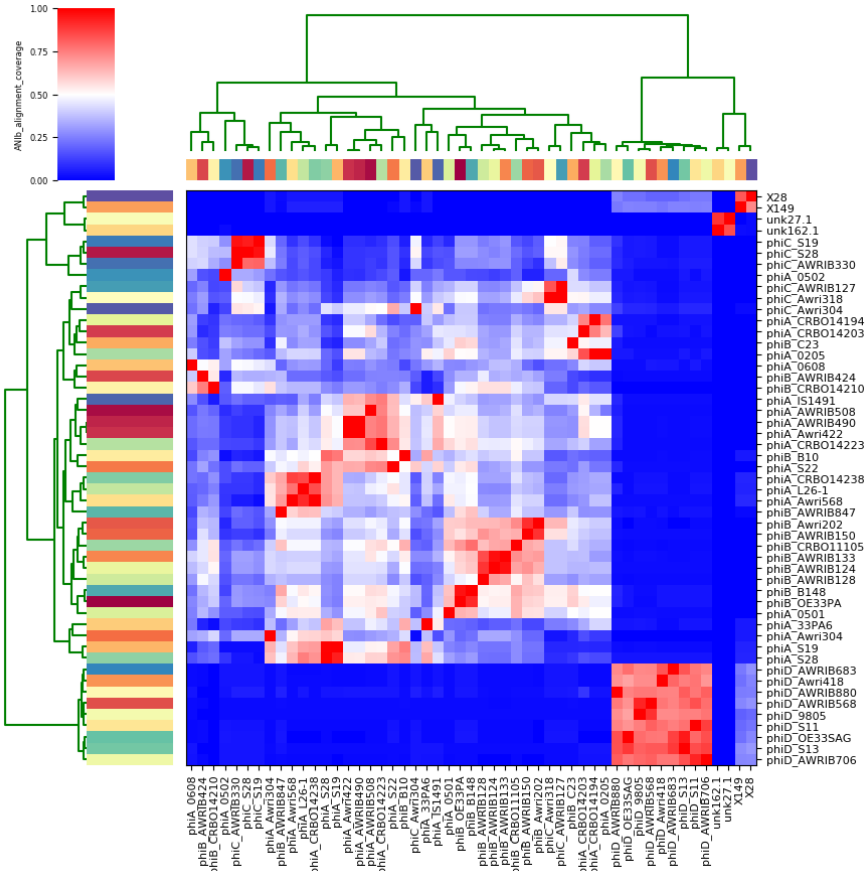
N° éch	Château	Type de vin	Cépage	Stade	oenophages				
					A	B	C	D	Non-ABCD
12	I	Blanc	Semillon	Début FA	A12.2				unk12.2
26		Blanc	Semillon	Fin FA		B26.1			
						B26.2			
5		Blanc	Sauvigon	Moût					unk5.1
10		Blanc	Sauvigon	Début FA		B10.2			
9		Blanc	Muscadelle	Moût					unk9.1
24		Blanc	Muscadelle	Mi FA		B24.1			
25		Blanc	Muscadelle	Fin FA	A25.2	B25.2			
128		Blanc	Sauvigon Gris	vin fini	A128.2				
27		Rouge	Merlot	moût					unk27.1
									X27.1
49		Rouge	Merlot	FML	A49.1				
83		Rouge	Merlot	FML	A83.1				
85		Rouge	Merlot/Cabernet Franc	vin fini	A85.1				
51		Rouge	Cabernet Sauvignon	FA	A51.2				
84		Rouge	Cabernet Sauvignon/Merlot	vin fini	A84.1				
102		Rouge	Petit Verdot	FML	A102.2				
15	II	Blanc	Sauvignon/Semillon	FA	A15.2				
29		Blanc	Semillon	Fin FA	A29.2				
45		Rouge	Merlot	Fin FA		B45.1			
72		Rouge	Merlot	FA terminée (Après décuvage)	A72.2				
76		Rouge	Merlot	Fin FML		B76.1			
						B76.2			
77		Rouge	Cabernet Sauvignon	Fin FML		B77.2			
133		Rouge	Merlot	vin fini		B133.2			
16	III	Rouge	Merlot BIO	FA		B16.2			
28		Rouge	Merlot BIO	fin FA					X28.2
56		Rouge	Merlot BIO	FML	A56.2				
81		Rouge	Merlot BIO	FML	A81.1				
82		Rouge	Merlot BIO	fin FML		B82.2			
98		Rouge	Merlot BIO	FML Terminée		B98.2	C98.2*		
99		Rouge	Merlot BIO	FML terminée	A99.2				
109		Rouge	Merlot BIO	FML terminée	A109.1				
47		Rouge	Merlot CONV	FA terminée (écoulage)	A47.1				unk47.1
53		Rouge	Merlot CONV	FA terminée (écoulage)	A53.2				
75		Rouge	Merlot CONV	FA terminée (Après décuvage)		B75.1			
96		Rouge	Merlot CONV	FML		B96.2			
97		Rouge	Merlot CONV	FML		B97.2			
107		Rouge	Merlot CONV	FML		B107.2	C107.2*		
108		Rouge	Merlot CONV	FML		B108.1			
						B108.2			
17	IV	Blanc	Semillon	PDC		B17.2			
78	V	Rouge	Cabernet Franc	Fin FA		B78.1			
						B78.2			
111	VI	Rouge	Merlot	FML		B111.1			
						B111.2			
87		Rouge	Merlot	Fin FA		B87.1			
						B87.2			
89		Rouge	Merlot	FA terminée (écoulage)		B89.2			
112		Rouge	Merlot	FML		B112.1			
88		Rouge	Merlot	Fin FA		B88.1			
						B88.2			
113		Rouge	Merlot	FML		B113.1			
90		Rouge	Cabernet Franc	FinFA	A90.1				
					A90.2				
95		Rouge	Cabernet Franc	FML	A95.1				
104		Rouge	Cabernet Franc	Fin FML	A104.1				
91		Rouge	Cabernet Sauvignon	Fin FA		B91.1			
114		Rouge	Cabernet Franc ou Sauvignon	FML		B114.1			
						B114.2			

Annexe V. Valeurs d'ANIb entre les oenophages (A) selon le pourcentage de couverture des génomes comparés (B). Les calculs ont été réalisés grâce à Jspecies.

A)



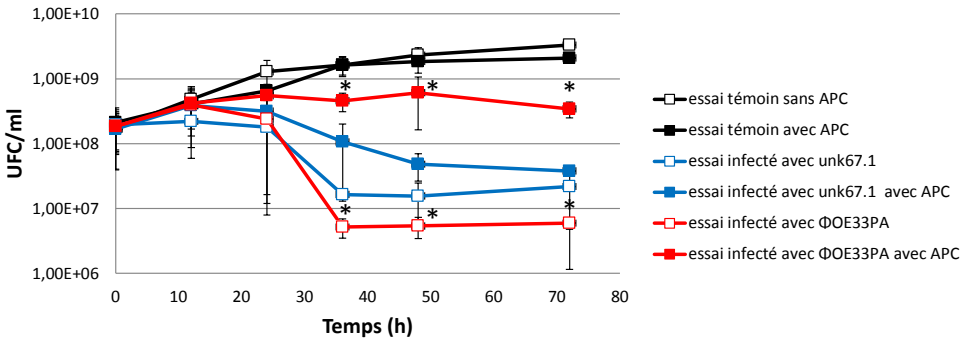
B)



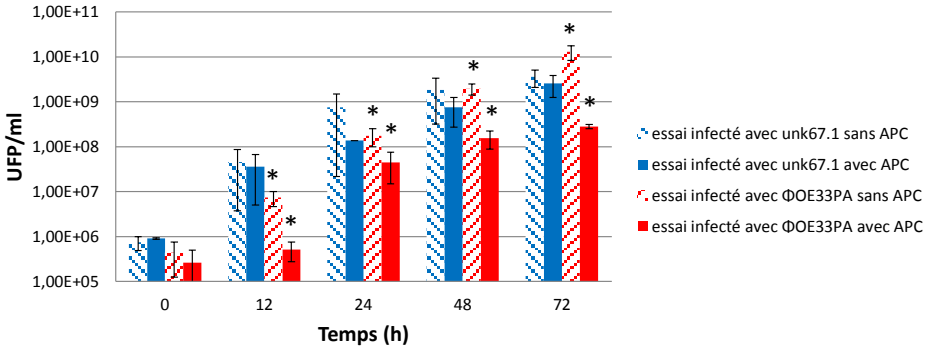
Annexe VI. Impact de l'acide *p*-coumarique (APC, 1) et de la myricétine (2) sur le développement lytique des phages OE33PA et unk67.1. Le suivi des populations a été réalisé par dénombrement des bactéries (a) et des phages actifs (b).

1)

a)

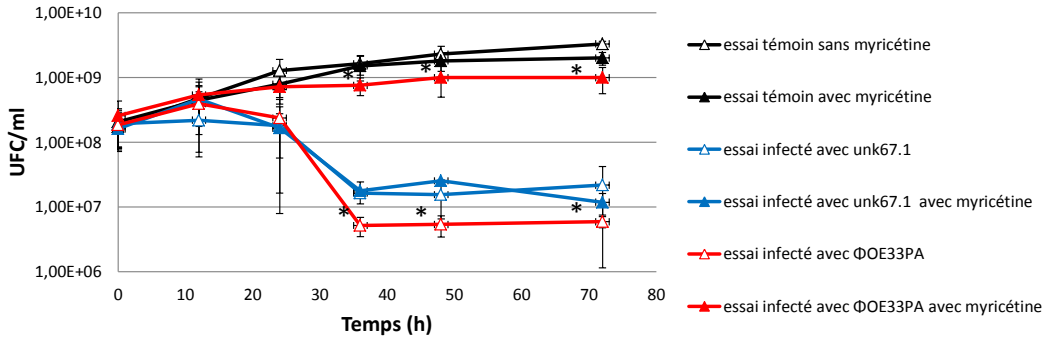


b)

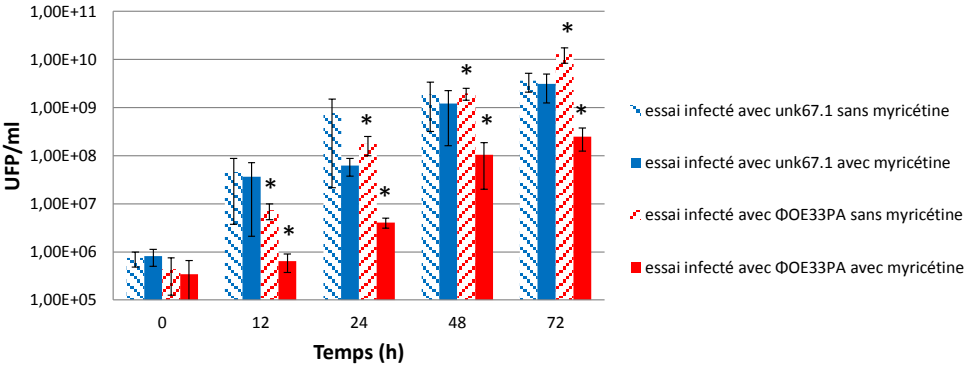


2)

a)



b)



Annexe VII. Utilisation de la Digital Droplet PCR pour évaluer la stabilité des prophages chez *O. oeni*.

L'étude des oenophages dans leur environnement naturel a mis en évidence l'existence de phages lytiques professionnels, dont l'action peut moduler la population, en nombre et en diversité. Notre analyse montre également l'existence de phages tempérés. Parmi eux, les phages tempérés ABC échangent des gènes entre eux, ce qui génère une diversité importante. *A contrario*, les prophages D constituent un groupe très homogène. Cette distinction en matière de diversité des génomes peut être reliée à une différence dans les cycles de vie des phages (lytique *vs* lysogénique) et donc à une possible différence dans la stabilité de la lysogénie au sein des deux groupes de phages tempérés (ABC et D). La mesure des taux d'excision spontanée confirme la plus forte stabilité des prophages D par rapport aux autres phages. La lysogénie pourrait répondre à une évolution adaptative des souches et les prophages pourraient améliorer la persistance des souches dans l'environnement. Les prophages pourraient apporter des gènes conférant une meilleure résistance aux contraintes et/ou permettraient une meilleure adhésion aux matériels dans les chais. Nous avons donc souhaité appréhender plus finement la stabilité de la lysogénie en fonction de différents facteurs : le type de prophage, l'environnement génétique de la souche abritant le prophage, et enfin les conditions de culture. Une approche moléculaire a été choisie et nous nous sommes tournés vers la technique de Digital Droplet PCR (ddPCR). Cette PCR dite de 3ème génération consiste en la quantification absolue des échantillons, sans gamme standard, en technologie EvaGreen ou sondes fluorescentes. La technique de PCR employée est une technique de microfluidique, basée sur la partition des échantillons en 20000 gouttelettes par émulsion eau-huile. Les matrices présentes dans chacune des gouttelettes individuelles sont ensuite amplifiées par PCR, et le nombre de copies/µl est calculé en s'appuyant sur la loi statistique de Poisson (Hindson *et al*., 2011).

La ddPCR a été récemment utilisée pour quantifier des agents pathogènes alimentaires ou encore des bactéries du sol (Kim *et al*., 2014; Klančnik *et al.,* 2015). Ses avantages par rapport à la qPCR sont nombreux :

- elle permet une quantification absolue : titre exact en nombre de copie par µl. Il n'est plus nécessaire d'établir une courbe standard préalable (expression génique par ratio direct, pas de ΔΔCt) ;
- elle est plus sensible : elle permet la détection de mutations rares, fonctionne avec des ARN dégradés et est moins sensible aux inhibiteurs (Prcellato *et al*., 2016) ;

- elle est plus précise, +/- 10% précision c'est-à-dire 0,15 Ct. Il n'est également plus nécessaire de faire des réplicats techniques.

Les expériences ont été menées à la plateforme transcriptome du Neurocentre Magendie de Bordeaux, et nous avons bénéficié de l'expertise du responsable ddPCR, Thierry Leste-Lasserre.

1. Mise au point de la ddPCR

• Nous avons retenu 5 souches dans cette étude préliminaire (**Tableau I**). Les souches CiNe et B10 abritent trois prophages de type A, B ou C. Les prophages A et B issus des souches CiNe et B10, respectivement, ont été transférés dans la souche IOEB277. Ceci répond à l'objectif de pouvoir étudier l'éventuel impact du fond génétique de la souche sur la stabilité de la lysogénie. Enfin nous avons lysogénisé la souche IOEB277 par un phage D, le phage 33SAG. Nous pouvons donc comparer la stabilité de trois phages A, B et D dans la même souche. Enfin, il est à noter que parmi tous les phages à notre disposition, nous avons jugé utile de sélectionner les deux phages montrant les taux d'excision spontanée les plus extrêmes : B10 a une lysogénie instable et produit spontanément une concentration élevée en phages (10^4 à 10^5 UFP/ml). A l'opposé, le taux d'excision spontané est très modeste chez la souche IOEB S277 lysogène pour le phage SaG (0-10 UFP/ml).

Tableau I. Choix des souches utilisées et de leurs prophages.

Souche	Prophage
CiNe	A/C
IOEB277-Aciné	A
B10	B
IOEB277-10MC	B
IOEB277-33SAG	D

• Nous avons défini des couples d'amorces spécifiques des 3 prophages testés. Pour chaque type de prophage (A, B, C et D), nous avons défini un **couple spécifique de l'état intégré**, qui cible la jonction *attL*. Chaque couple (A à D) permet d'amplifier le *tRNA* cible de l'insertion ainsi qu'une partie du gène de l'intégrase du prophage (**Tableau II**).

Tableau II. Séquences des amorces *attL*

	F (Tm)	R (Tm)
***attL* A**	CTTGATTGGAACTATCCCGA (56)	AGTGTGGCAAATTTGTGGCA (60)
***attL* B**	ACGCATAATAAACTGCTTAAA (51)	GACTGCGTTTAAGCAAAC (50)
***attL* C**	TTTGTTGCGTAAAAAGCAAT (54)	TGCATTTGTTGTGCATTGTG (58) GAC AAG GTC ACT GAT TTA AT (52)
***attL* D**	GTCTAACACTCAGAAGCCGA (54)	TGCAAAAAGTGTGCAAAGTG (54) GCA ATG AAG ATA TTT TAG TG (50)

Par analyse comparative des génomes et réalisation de PCR *in silico*, nous avons ensuite vérifié que tous les oenophages connus dans les groupes A, B, C et D répondent aux PCR *attL* correspondantes. Ce travail a été réalisé avec Hugo Campbell-Sills. Cette étape est nécessaire dans l'objectif ultérieur d'appliquer la ddPCR à des échantillons de vin, dont le contenu en phages sera plus divers.

En appliquant la même démarche, nous avons également défini des couples d'amorces dans les gènes codant les intégrases A, B, C et D. Elles correspondent aux séquences proposées par Jaomanjaka *et al*. (2013). **Ces réactions permettront d'amplifier la population totale en ADN phagique intégré et éventuellement libre dans le cytoplasme après excision** (pseudo-lysogénie ou retour en cycle lytique post-induction). Les culots cellulaires étant lavés avant extraction de l'ADN, ces PCRs ne détectent pas les phages libres (encapsidés). Enfin, nous avons utilisé un couple d'amorces spécifiques de l'espèce *O. oeni*, défini dans la séquence du gène *rpoB*, déjà utilisé au laboratoire et présent à une copie unique dans le génome de la bactérie. **Le couple RpoB permet de dénombrer la population totale de *O. oeni*, constituée de souches lysogènes ou non**. Notre objectif est d'étudier la variation du ratio entre les populations lysogène/ totale dans les échantillons et d'identifier les paramètres qui influencent ce ratio (type de phage, conditions de croissance, ou encore fond génétique de la souche).

• Les amplicons ont une taille attendue d'environ 400 pb et une première vérification a été réalisée au laboratoire en qPCR. L'objectif était de valider les amorces dans les conditions d'amplification préconisées en ddPCR. Chaque souche bactérienne a été cultivée en MRS à pH 4,8 et à 25°C. Un volume de 1 ml de culture a été prélevé aux DO_{600} de 0,4 et 1,2 afin d'extraire l'ADN des différentes souches en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. Le protocole habituellement utilisé pour extraire l'ADN bactérien à partir d'échantillons de vin a été utilisé. Il comporte une étape de lyse mécanique en présence de billes de verre, l'utilisation d'une solution de lyse chimique (Nuclei Lysis Solution et Protein Lysis Solution, Promega) et enfin l'ajout de PVP (10%) afin d'éliminer les composés phénoliques (Campbell-Sills *et al*., 2015). L'ADN extrait a été repris dans un volume de 30

µl d'eau milli-Q stérile. Les concentrations mesurées étaient comprises entre 204 et 327 ng/µl. Un volume de 1 µl de chaque ADN dilué au 1/200 a été utilisé dans les réactions préparées avec le mélange réactionnel utilisé en ddPCR (Evagreen). Dans des conditions de PCR classique, toutes les réactions ont donné les résultats attendus. Nous avons ensuite réalisé nos premiers essais en ddPCR. Le couple *rpoB* n'a pas donné l'amplification attendue. Ceci peut être lié à un problème spécifique dans son émulsion et ce phénomène amorce-dépendant a déjà été observé à la plateforme du Neurocentre (Thierry Leste-Lasserre, communication personnelle). Nous avons donc dessiné un nouveau couple d'amorces spécifiques d'*O. oeni* sur le même gène, RpoBqOF (5'-ATGGAACGTGTTGTCCGCGA-3') et RpoBqOR (5'-GGATTGGTTTGATCCATGAA-3'), qui s'est révélé fonctionnel en ddPCR. Les données obtenues sont présentées **Figure 1**.

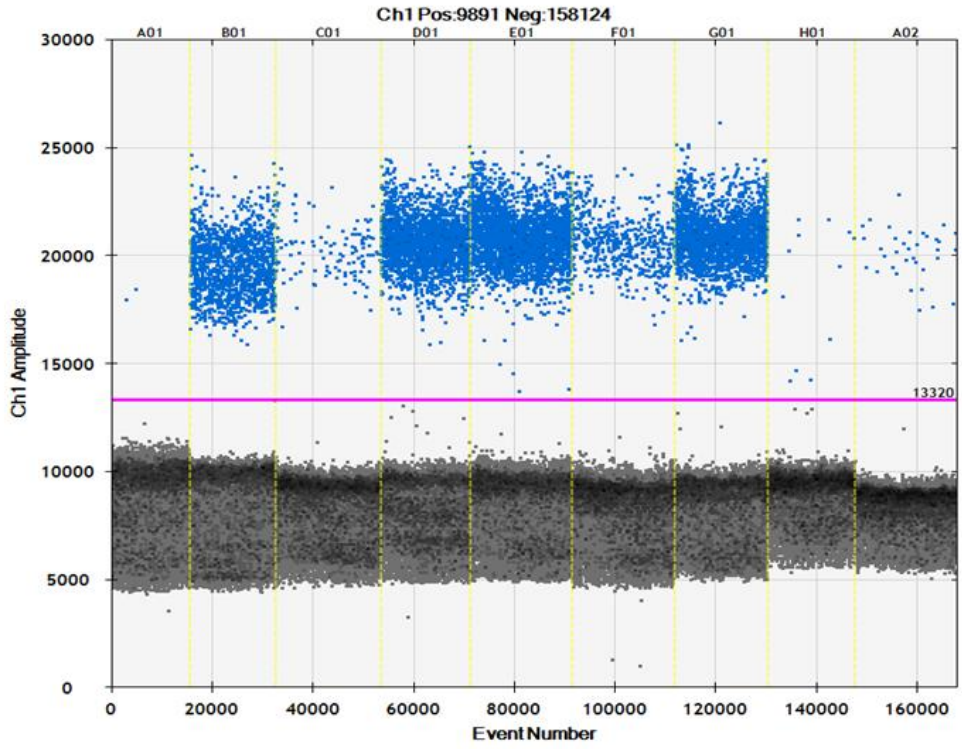


Figure 1. Détection par ddPCR de la cible *RpoB* utilisée dans cette étude. Une barre de seuil est ajustée manuellement et permet de distinguer les gouttelettes détectées comme positives (au dessus) ou négatives (en dessous).

2. Dénombrement des populations bactériennes en fonction de la phase de croissance

Nous n'avons pas extrait les mêmes quantités d'ADN à partir de tous les échantillons de culture, même si le prélèvement initial correspondait à un même volume (1 ml) et une même DO. La quantité de cibles mesurée en ddPCR a donc été ramenée à la quantité totale d'ADN extraite à partir d'un ml

de culture. Nous présentons donc des quantités de cible/ng d'ADN extrait (**Figure 2B**). Les valeurs de dénombrement sur boîtes sont données en parallèle (UFC/ml) (**Figure 2A**).

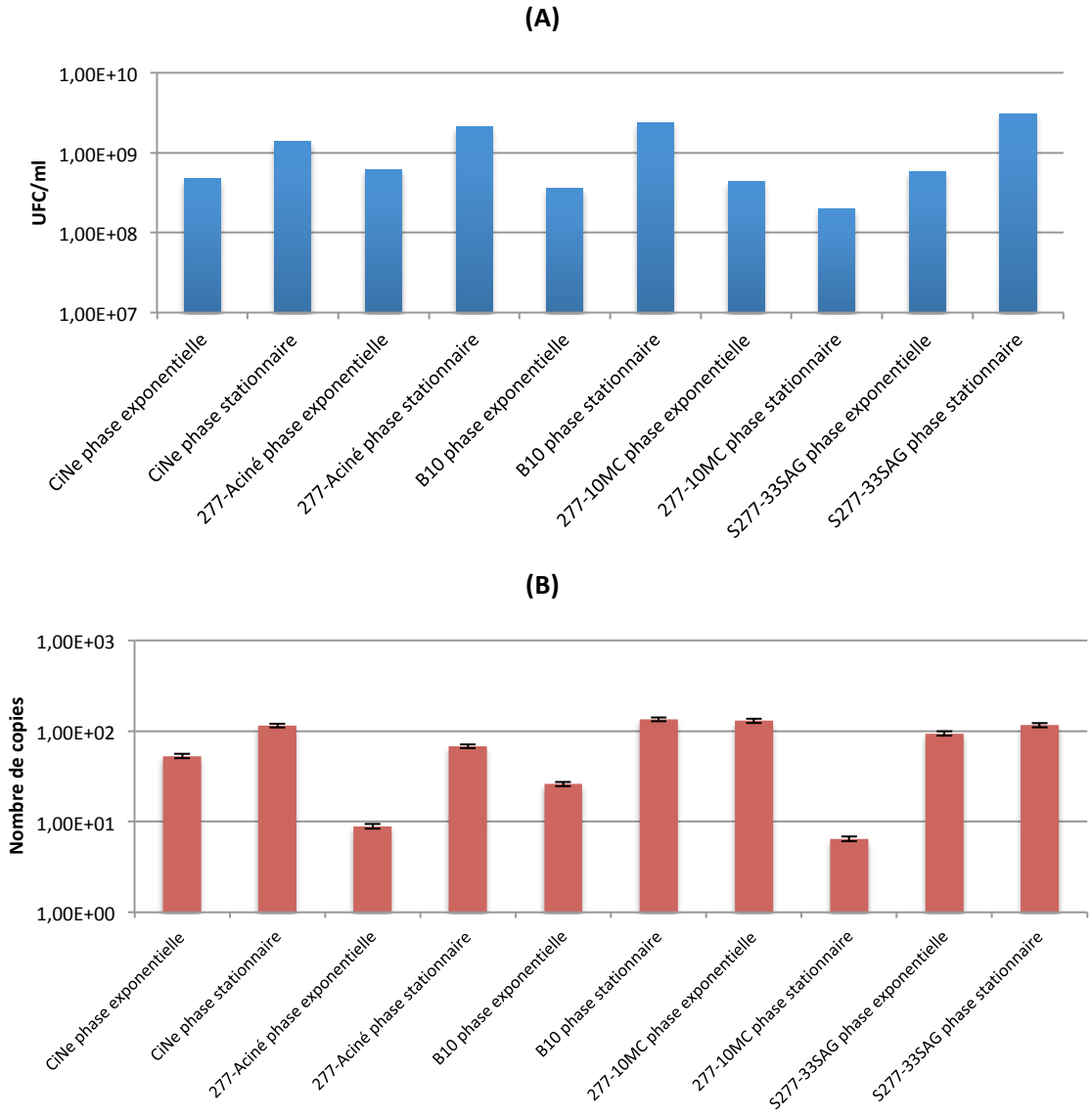


Figure 2. Détection de la population d'*O.oeni* en culture MRS par dénombrement (UFC/ml) (A) et par ddPCR en utilisant le couple RpoB (B).

Par dénombrement sur gélose, nous observons que les concentrations en bactéries sont supérieures en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle. Seule la souche IOEB S277-Φ10MC montre une diminution de la population. On peut donc penser à un phénomène de lyse lié à une induction accrue des prophages en phase stationnaire. Le phénomène n'est pas observé chez la souche B10. Le phage Φ10MC ne montre donc pas le même taux d'excision spontané en fonction de la souche qui l'abrite dans son génome.

Par ddPCR, nous observons des concentrations comparables en cible/ng d'ADN compatibles pour 4 échantillons : CiNe (phase exponentielle), B10 (phase exponentielle), IOEB S277 (Φ10MC) et IOEB(SaG) avec des valeurs de l'ordre de 110 à 130 cibles/ng d'ADN. Cependant, les valeurs observées sur les autres cultures sont nettement plus basses et il est possible que les qualités des ADNs ne soient pas les mêmes dans ces premiers essais. Dans la suite des expériences nous ne pourrons pas comparer les valeurs absolues de cibles. Le seul paramètre permettant une comparaison entre les échantillons sera le rapport des ddPCR attL/rpoB et int/rpoB.

3. Fréquence de la lysogénie en fonction de la phase de croissance

Une analyse préliminaire a été menée et nous avons évalué le rapport entre la population bactérienne et la population lysogène sur les phases exponentielle et stationnaire (cibles/ng d'ADN estimées par ddPCR attL *vs* cibles/ng d'ADN estimées par ddPCR RpoB). La souche non lysogène IOEB S277 a été utilisée comme témoin négatif lors des PCR ciblant les séquences phagiques (afin de fixer la barre de seuil).

• Les résultats obtenus pour le prophage le plus stable, OE33SAG sont présentés **Figure 3**. Nous observons les taux de lysogénie (% populations bactériennes lysogènes/totales) sont de 74% et 57% en phase exponentielle et stationnaire, respectivement, ce qui suggère une certaine stabilité de la lysogénie. La légère baisse du taux de lysogénie n'est pas corrélée à une augmentation de détection des séquences virales (intégré+libre). En effet, l'évolution de la concentration totale en ADN phagique (intégré + libre)/population totale évolue de la même manière (92% à 45%) entre les deux phases de culture. Cette stabilité est en accord avec l'absence de phages libres dans les cultures (< 10 UFP/ml).

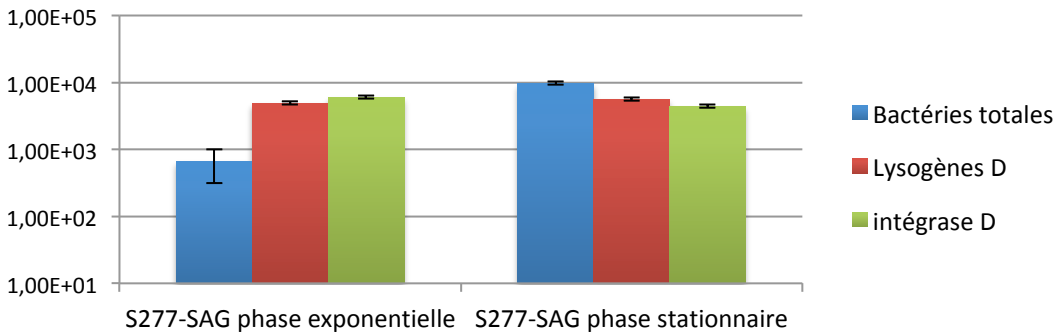


Figure 3. Evaluation de la lysogénie de la souche IOEB S277 (OE33SAG) par ddPCR. Les valeurs représentent le nombre de cibles mesurées par ng d'ADN extrait. La population bactérienne totale est mesurée à l'aide du couple RpoB (bleu) et la population de souches lysogènes est mesurée par le couple attLD (vert). La concentration en génomes phagiques dans les cellules (intégré+libre) est mesurée à l'aide du couple intD (rouge).

• Les résultats obtenus pour les deux souches porteuses du prophage CiNeA (**Fig. 3**) sont différents de ce que nous avons observé précédemment. Pour la souche IOEB S277, le taux de lysogénie baisse légèrement en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle (94% à 64%). Ceci est accompagné d'une augmentation de la détection de cibles (130% à 240%). La situation dans la souche CiNe est différente. Le taux de lysogénie est faible (1% et 0.14% sur les phases exponentielle et stationnaire, respectivement). Les détections de séquences virales restent très basses elles-aussi (0,035% et 0,08%). Il y a certainement sur cette souche un artéfact au niveau de l'amplification, qui peut être lié à la qualité moindre de l'ADN.

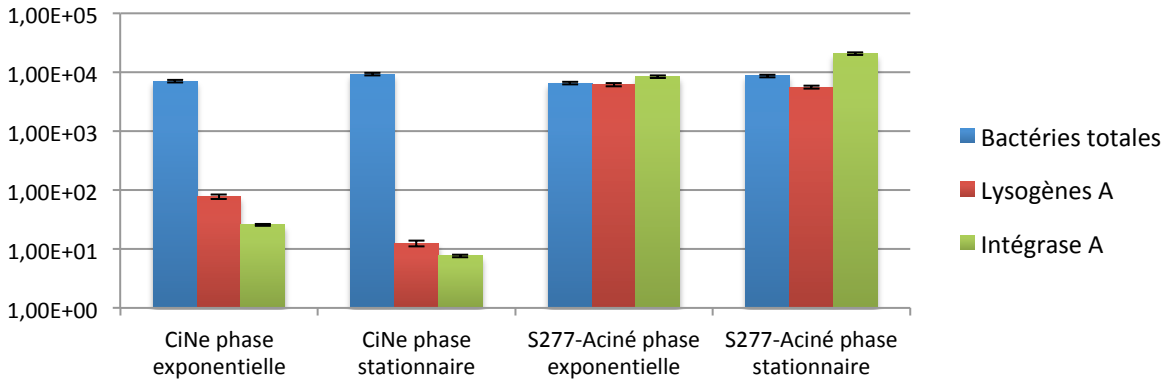


Figure 4. Evaluation de la lysogénie des souches CiNe et IOEB277 (CiNe) par ddPCR (cibles/ng d'ADN). La population bactérienne totale est mesurée à l'aide du couple RpoB (bleu) et la population de souches lysogènes est mesurée par le couple attLA (vert). La concentration en génomes phagiques dans les cellules (intégré+libre) est mesurée à l'aide du couple intA (rouge).

Enfin, les résultats pour les deux souches portant le phage Φ10MC sont présentés **Fig. 4.** Dans cette expérience, nous observons que la population lysogène est plus faible que la population totale.

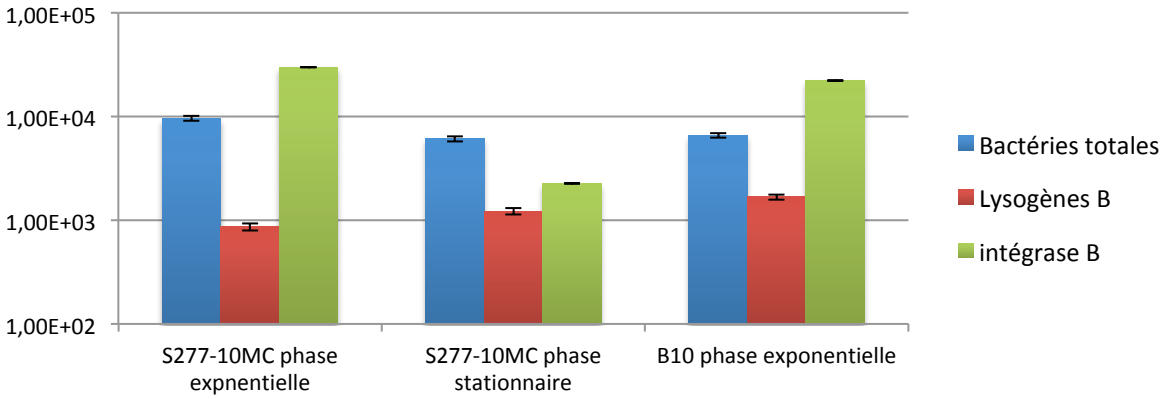


Figure 5. Evaluation de la lysogénie de la souche IOEB277 (Φ10MC) par ddPCR (cibles/ng d'ADN). La population bactérienne totale est mesurée à l'aide du couple RpoB (bleu) et la population de souches lysogènes est mesurée par le couple attLB (vert). La concentration en génomes phagiques dans les cellules (intégré+libre) est mesurée à l'aide du couple intB (rouge).

Le taux de lysogénie est faible chez la souche IOEB S277(Φ10MC) avec des valeurs de 9% et 20% sur les phases exponentielle et stationnaire. La valeur est proche pour la souche B10 en phase exponentielle (25%). Ces résultats indiqueraient comme chez les phages A une instabilité de l'intégration. La quantité de cibles phagiques est forte, particulièrement en phase exponentielle pour les deux souches (310 et 337%) qui semble confirmer une excision du prophage et un retour au cycle lytique.

Ces premières expériences sont à présents à renouveler avec une attention particulière vis à vis de l'obtention d'extraits d'ADN de même qualité.

4. Première exploration de la dynamique de la lysogénie au cours de la FML

Nous avons sélectionné 4 suivis de FML au cours desquels des échantillons ont été collectés au début et en fin de FML. Aucun accident ou retard n'a été observé. Les phages libres et la population de BL ont été dénombrés dans les 8 échantillons (**Tableau III**).

Tableau III. Echantillons en cours de FML sélectionnés pour évaluer le pourcentage de lysogénie.

Suivi	n°éch	Cépage	Stade	BL (UFC/ml)	Phages protocole 1 (UFP/ml)	Phages protocole 2 (UFP/ml)
FML1	102	Petit Verdot	début FML	1,87E+06	<10	1,00E+01
	106	Petit Verdot	fin FML	6,00E+06	<10	<10
FML2	72	Merlot	début FML	2,33E+05	<10	2,00E+03
	76	Merlot	fin FML	8,28E+06	2,00E+01	1,70E+05
FML3	49	Merlot	début FML	1,96E+05	1,00E+01	<10
	83	Merlot	fin FML	5,90E+05	3,00E+01	<10
FML4	96	Merlot	début FML	1,45E+06	<10	2,00E+01
	108	Merlot	fin FML	2,50E+07	2,00E+01	2,60E+03

- Une première estimation de la lysogénie a été menée par PCR classique sur les suivis de FML n°1 et 4. Sur les boîtes de dénombrement, 15 colonies (environ 10% des bactéries dénombrées) ont été repiquées dans 30 µl d'eau physiologique puis déposées sur membrane FTA afin d'extraire l'ADN génomique. Les colonies ont été soumises à la PCR RpoB et aux 4 PCR attL. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV**.

Tableau IV. Pourcentage de lysogénie estimé par PCR classique sur colonies (n=15 par échantillon)

FML	n°éch	Lysogènes A	Lysogènes B	Lysogènes C	Lysogènes D
FML1	102	33%	0%	0%	0%
	106	40%	0%	0%	0%
FML4	96	7%	80%	80%	0%
	108	0%	93%	93%	0%

Nous observons la présence de souches lysogènes pour les phages A, B ou C à l'étape de la FML et l'absence de souches lysogènes pour les phages D. L'analyse de la structure de la population d'*O. oeni* a récemment montré que les souches du vin appartiennent au groupe MLSTA, et que les prophages D sont plutôt rares dans ce groupe.

Dans le suivi FML n°1, les résultats montrent que nous détectons uniquement des lysogènes de type A au cours de la FML n°1, et que ce taux augmente légèrement au cours de cette FML, passant de 33 à 40%. Au cours de la FML n°4, différents types de lysogènes sont détectées. En début de FML, nous détectons 80% de souches lysogènes B et C, et seulement 7% de lysogènes A. En fin de FML, aucune colonie ne s'est révélée être lysogène de type A alors que le taux de lysogènes B et C a augmenté et représente la grande majorité des colonies repiquées (93%). Ces résultats suggèrent une stabilité de la lysogénie au cours des 2 FML analysées.

Pour les 4 suivis, nous avons ensuite extrait l'ADN des échantillons et évalué le taux de lysogénie par ddPCR (**Tableau V**). Les résultats pour le suivi FML 1 sont représentés sur la **Figure 6.**

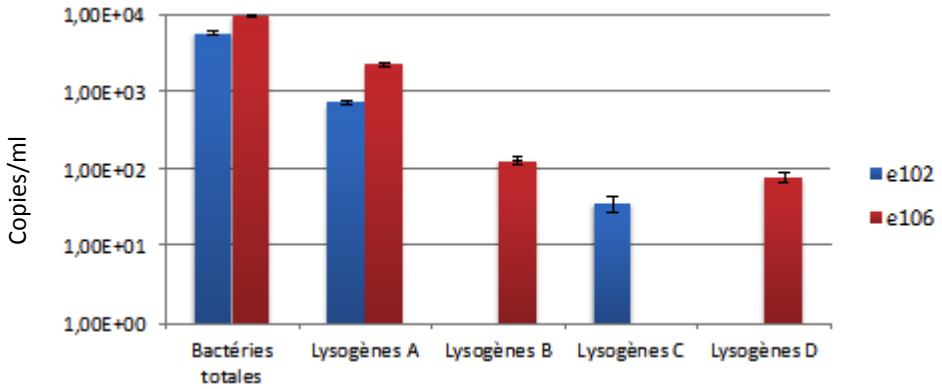


Figure 6. Quantification des différentes lysogènes et de la population totale d'*O.oeni* en FML dans les échantillons de vin en FML 102 et 106.

L'approche par ddPCR confirme la prévalence des souches lysogènes pour les prophages de type A pendant la FML et la stabilité de la lysogénie. Les prophages B et C sont détectés en faible concentration uniquement en fin de FML, traduisant une légère progression de la population

lysogène correspondante. *A contrario*, les prophages C sont détectés en début de FML et disparaissent en fin d'étape. Les prophages B, C et D n'avaient pas été détectés par PCR sur colonie car leur taux est inférieur au seuil de détection de l'approche PCR sur colonie qui est de 6%. Les taux de lysogènes A quantifiés évoluent de 33 à 40% en ddPCR et de 13 à 23% par PCR sur colonies. Lors de la ddPCR, la quantification s'effectue sur l'ADN extrait d'un culot bactérien, comprenant des cellules mortes ou altérées. Nous pouvons donc également supposer que la ddPCR surestime certaines populations bactériennes.

Les comparaisons des résultats obtenus pas les deux techniques ont été faites pour le suivi FML 4 (**Tableaux VI et V**). La ddPCR confirme la prévalence des souches lysogènes pour les phages de types B et C et leur légère augmentation dans le vin en cours de FML. Les taux sont ici plus faibles que ceux mesurés en PCR sur colonies. Enfin la ddPCR confirme la faible présence de souches lysogènes de type A et l'absence de souches lysogènes de type D.

Tableau V. Pourcentage de lysogénie estimé par ddPCR.

FML	N°éch	Lysogènes A	Lysogènes B	Lysogènes C	Lysogènes D
FML1	102	12,77	0,00	0,64	0,00
	106	22,84	1,30	0,00	0,80
FML2	72	62,75	0,40	84,56	1,17
	76	26,39	0,00	56,90	0,00
FML3	49	66,67	0,00	66,67	0,00
	83	18,06	1,67	6,67	0,00
FML4	96	0,32	15,59	27,96	0,00
	108	1,55	30,53	46,90	0,00

Enfin, l'analyse par ddPCR montre que les souches lysogènes dominantes sont de type A et C pour les deux FML N°2 et N°3. Pour ces deux fermentations, la proportion par rapport à la population globale chute entre le début et la fin de FML.

Afin d'émettre des hypothèses concernant les dynamiques de populations bactérienne et phagique pendant la FML, nous pouvons coupler nos résultats de quantification de populations de lysogènes ainsi que ceux du dénombrement de BL et dénombrement de phages actifs (**Tableau VI/Chapitre I**).

La ddPCR montre que les deux FML (N°2 et N°3) présentant un taux de lysogénie décroissant au cours de la FML contiennent majoritairement des souches lysogènes de type A (FML N°2) et B/C (FML N°3). Ceci est compatible avec les types de phages libres isolés à partir de ces échantillons (Chapitre I). Ces deux FML ont montré une durée un peu plus longue, de 21 à 22 jours. Il est à noter qu'au cours de la FML n°3, la population de BL n'atteint pas les 10^6 UFC/ml généralement observées. De

plus, les phages libres ont été isolés grâce au protocole 1, suggérant une induction spontanée des prophages dans le vin au cours de ces FML.

Les FML N°1 et N°4 montrent un taux de lysogénie croissant, une population bactérienne totale élevée, et une durée de fermentation qui n'excède pas 11 jours. La population lysogène est élevée, et constituée de souches lysogènes pour les types A et C. Seuls des phages A (et quelques B) ont été isolés de ces vins. L'absence de phages libres de type C peut être reliée à notre hypothèse que ces prophages sont défectifs et ne s'induisent pas ou ne peuvent former de particules après induction.

Tableau VI. Synthèse de la dynamique des populations bactérienne et phagique en FML

FML	**Lysogénie (PCR clas/ddPCR)**			**Phages**	**Déroulement de la FML**	
	évol. taux Début-fin	Lysogènes présents	Lysogènes majoritaires	Phages libres isolés	Durée	BL (UFC/ml)
FML1	↗	A, B, C	A (max 23%)	A	8	6,00E+06
FML2	↘	A, B, C, D	A (max 63%) C (max 85%)	A/B	22	8,28E+06
FML3	↘	A, B, C	A (max 67%) C (max 67%)	A	21	5,90E+05
FML4	↗		B (max 31%) C (max 47%)	B/C	11	2,50E+07

5. Conclusion

L'outil ddPCR est clairement un outil d'avenir pour le suivi dynamique des populations bactériennes au cours des fermentations. Il est complémentaire des autres approches et l'ensemble pourra apporter les réponses essentielles quant au rôle des interactions phage-hôte pendant la vinification. Il conviendra à l'avenir de traiter un nombre plus important de suivis par cette approche. L'objectif sera notamment de préciser si le déroulé de la FML est plus favorable (a) dès lors que le taux de lysogènes dans la population bactérienne est plus faible, et/ou (b) dès lors que certains types de prophages sont absents (limitant la perte de biomasse par induction) ou présents (prophages apportant un fitness aux souches). L'achat d'un équipement de ddPCR sur la plateforme Génomique de Bordeaux permettra de compléter les expériences de ddPCR.