



HAL
open science

Étude des interactions entre bactéries lactiques œnologiques *Cenococcus ceni*. Analyses cinétiques et modélisation

Noura Fahimi

► **To cite this version:**

Noura Fahimi. Étude des interactions entre bactéries lactiques œnologiques *Cenococcus ceni*. Analyses cinétiques et modélisation. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2012. Français. NNT : 2012INPT0008 . tel-04225359

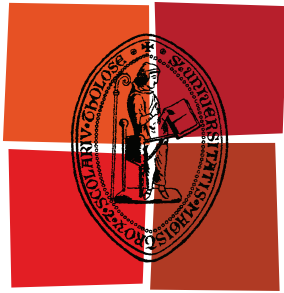
HAL Id: tel-04225359

<https://theses.hal.science/tel-04225359v1>

Submitted on 2 Oct 2023

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 Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Génie des Procédés et Environnement

Présentée et soutenue par :

Noura FAHIMI

le : mercredi 29 février 2012

Titre :

Étude des interactions entre bactéries lactiques œnologiques
Cenococcus oeni. Analyses cinétiques et modélisation

Ecole doctorale :
Mécanique, Énergétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503

Directeur(s) de Thèse :

Patricia Taillandier
Cédric Brandam

Professeur INP-ENSIACET, Toulouse
Maître de conférences HDR, INP-ENSIACET, Toulouse

Rapporteurs :

Aline Lonvaud-Funel
Alexandre Hervé

Professeur faculté d'œnologie, Bordeaux 2
Professeur IUVV, Dijon

Membre(s) du jury :

Magali Délérís-Bou
Pierre Strehaiano

Ingénieur de recherche, SA Lallemand, Toulouse
Professeur INP-ENSIACET, Toulouse

Remerciements

Je remercie Mesdames Aline Lonvaud-Funel et Magali Bou, Messieurs Hervé Alexandre et Pierre Strehaiano d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime ma gratitude et mes remerciements à ma directrice de thèse Madame Patricia Taillandier pour l'opportunité qu'elle m'a offerte pour travailler dans ce projet ANR DIVOENI et la confiance qu'elle m'a démontré durant ces années au département BioSyM du Laboratoire de Génie Chimique.

Mes sincères remerciements à Monsieur Cédric Brandam d'avoir co-encadré cette thèse. Ma respectueuse reconnaissance pour son attention, ses conseils et sa confiance. Merci de m'avoir initié aux méthodes de calculs en modélisation.

Je remercié également le personnel de l'équipe BioSyM : Alain, Audrey, Régine, Marie line, Benjamin, Luc, Marion, Florence, Carmen, Stéphane, claire et claire.

Ma reconnaissance sincère pour les aides du personnel technique et administratif : Alain Philipe, Christine Taurines, Danielle Bouscary, Jean Luis Nadalin, Bernard, Inyess, Lahcen, Jakci, Patricia Nouvet.

Merci aux collègues : Elida, Rafik, Safwan, Imourane, houssnain dont j'ai fait connaissance durant mon hébergement à l'ENSAT au cours du déménagement du laboratoire.

Harold Maffre merci pour tous les services que tu m'as rendus au labo.

Je n'oublierais pas les moments passé avec mes collègues au laboratoire : Rita, Pablo, Nabila, Mustapha, Johakim, Marianne, Ekin, Xuch, Omar, Juan, Amandine, Luis, Julien, Raphael, Youssef, Etienne, Diana, Aras, Jamal, Abdelwahed, Kamal, Hicham et Youn. Merci beaucoup à vous tous.

Mohammed Ziani merci pour ton aide et ton soutien de si loin.

Je remercie infiniment mes chers Professeurs Aziz Yasri, Aziz Bakri, El Mostapha Rakib et Oussama Abdelkhalek.

Lahoucine Boudiz merci pour tes encouragements de Colorado

Très particulièrement je remercie mes copines Fatima Mota, Mathilde François et Rim Zakaria, je vous suis très reconnaissante.

Grand merci à ma famille de Toulouse : Marie Claude Chatelain et Raphael Arches, vous êtes adorables.

Grand merci à ma Maman, Mon Papa, mes Sœurs et mes Frères.

Résumé

La Fermentation Malo-Lactique (FML) réalisée par *Enococcus œni* est une étape importante de la vinification qui doit être maîtrisée. Bien que les vinificateurs aient à leur disposition des souches *Enococcus œni* sélectionnées la FML n'est pas toujours réussie. Les conditions physico-chimiques (pH, éthanol, température), la composition du vin et les facteurs biologiques influencent l'activité de cette bactérie ; parmi ces dernières les interactions entre micro-organismes sont primordiales. Souvent, après la fermentation alcoolique par la levure, des souches indigènes d'*Enococcus œni* sont naturellement présentes dans le vin. Des interactions négatives peuvent alors se produire entre les souches autochtones et les souches sélectionnées apportées. Des connaissances sur ces interactions sont donc nécessaires. L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions pendant la FML entre 5 souches d'*Enococcus œni* issues de différentes niches écologiques. Pour cela, des expériences ont été effectuées dans du milieu MRS modifié et dans des conditions proches à celles du vin (20 °C ; pH 3,5 et 10 % d'éthanol). Nous avons tout d'abord caractérisé le comportement des souches en cultures pures à la fois dans les conditions de micro-aérobiose et d'anaérobiose. Une grande variabilité a été retrouvée entre les souches dans les 2 conditions : trois des 5 souches sont favorisées en conditions d'anaérobiose tandis que les deux autres se sont mieux développées en conditions de micro-aérobiose. La présence de 4 g.L⁻¹ d'acide L-malique dans le milieu permet de produire, pour toutes les souches, une biomasse environ 2 fois plus élevée que celle obtenue dans le milieu sans acide L-malique. La totalité de l'acide malique est consommée par les 5 souches mais avec des vitesses différentes. Pour une souche donnée la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique (v) et la vitesse spécifique de croissance (μ) présentent des profils similaires au cours de la FML. Elles ont été reliées par un modèle mathématique qui a permis de quantifier ce lien pour chaque souche. Les interactions lors des cultures mixtes des 10 couples formés par les 5 souches ont ensuite été étudiées dans un Bio-Réacteur à Membrane (BRM) en anaérobiose. Trois catégories ont été mises en évidence: interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte ; interactions à effet négatif sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effet positif sur la croissance de la souche la plus lente en culture pure et interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure. La comparaison des cultures pures et mixtes a révélé que l'activité spécifique de croissance des souches est affectée en culture mixte, ce qui provoque le prolongement de la phase de la latence dans le cas de l'inhibition et son raccourcissement dans le cas de la stimulation. La modélisation de la consommation d'acide L-malique a révélé pour certains couples une activation de la consommation de cet acide bien que la croissance soit fortement inhibée. Ces interactions, qui affectent le déroulement de la FML, ne peuvent être dues qu'à l'effet de métabolite(s) extracellulaire(s) excrétée(s) dans le milieu de fermentation. Ces métabolites restent à identifier.

Mots clés : *Enococcus œni*, croissance, Fermentation Malo-Lactique, Bio-Réacteur à Membrane, modèle, cultures mixtes, interactions microbiennes.

Abstract

In winemaking, the control of malolactic fermentation (MLF) by *Enococcus oeni* is an essential step for this process. Although winemakers have the availability for selected *Enococcus oeni* strains, the MLF is not always successful. The physical-chemical conditions (pH, ethanol, and temperature), the composition of wine, and biological factors, all together influence the activity of this bacterium; regarding biological factors, the interactions between microorganisms are essential. Often, after alcoholic fermentation by yeast, indigenous strains of *Enococcus oeni* are naturally present in wine, negative interactions can then occur between the indigenous strains and selected strains; therefore, knowledge on these interactions is needed. The goal of the present work was to study the interactions during MLF between five strains of *Enococcus oeni* from different origins. Experiments were performed in the modified MRS medium to be in nearly conditions to those of wine (20 °C, pH 3.5, and 10% ethanol). The characterization of the behavior of strains in pure cultures was done under both, micro-aerobic and anaerobic conditions; a large variability was found between the strains in the two conditions: three out of five strains were favored under anaerobic conditions while the two others were better developed in micro-aerobic conditions. The presence of 4 g.L⁻¹ of L-malic acid in the culture medium increased the biomass produced, about two-fold higher than that obtained in medium without L-malic acid. All of the L-malic acid is consumed by the five strains but at different specific rates. A mathematical model allowed to quantifying the relationship between the specific consumption rate of L-malic acid (ν) and the specific growth rate two specific rates for each strain; for a given strain, both rates have similar profiles during the MLF. Interactions in mixed cultures of 10 couples formed by the five strains were then examined in a Membrane Bioreactor (BRM) under anaerobic conditions. Three different interaction types were identified: 1) negative reciprocal interactions of the both strains in mixture culture, 2) interaction that affect negatively the favored strain in pure culture and positively the slowest one, and 3) interaction with positive effect on the fastest strain in pure culture. Comparison of pure and mixed culture showed that the specific activity of strains was affected in mixture culture causing the extension of the lag phase in the case of inhibition and its shortcut in the case of stimulation. Modeling of the consumption of the L-malic acid revealed activation of the consumption of this acid for some couples however, growth is strongly affected. The interactions affecting the course of the MLF are due solely to the effect of excreted extracellular metabolite(s); these metabolites remain to be identified.

Keywords: *Enococcus oeni*, growth, Malolactic Fermentation, Membrane Bioreactor, model, mixed culture, microbial interactions.

Table des matières

Table des matières

Table des matières	6
Liste des figures	10
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	17
Introduction générale	21
Chapitre I. Synthèse bibliographique	24
1. Vinification	25
1.1. Opérations de pré-fermentation	25
1.2. Fermentation alcoolique et macération	27
1.3. Spécificités de la vinification en rouge	30
1.4. Fermentation malo-lactique (FML)	30
1.5. Opérations post-fermentaires	31
2. Fermentation Malo-Lactique	32
2.1. Espèce <i>Ænococcus Æni</i>	33
2.1.1. Caractéristiques et taxonomie	33
2.1.2. Métabolisme et éléments génétiques chez <i>Ænococcus Æni</i>	34
2.1.3. Besoins nutritionnels	42
2.2. Facteurs influençant la fermentation malo-lactique	45
2.2.1. Débourage	46
2.2.2. Macération pelliculaire	47
2.2.3. Élevage sur lies	47
2.2.4. Potentiel d'hydrogène pH	48
2.2.5. Température	48
2.2.6. Anhydride sulfureux SO ₂	49
2.2.7. Éthanol	50
2.2.8. Acides gras	51
2.2.9. Composés phénoliques	51
2.2.10. Pesticides	53
2.2.11. Oxygène O ₂	53
2.2.12. Antimicrobiens	55
3. Interactions entre micro-organismes	58
3.1. Différents types d'interactions entre micro-organismes	58
3.1.1. Interactions directes	59
3.1.2. Interactions indirectes	59
3.1.3. Phénomène du 'Quorum Sensing'	61
3.2. Stratégies d'étude des interactions entre micro-organismes	63
3.2.1. Cultures en milieu solide	63
3.2.2. Cultures en milieux liquides	65
3.2.3. Techniques d'identification des interactions indirectes	67
3.2.3.1. Tubes de dialyses et supports perméables	67
3.2.3.2. Bio-Réacteur à Membrane	68
4. Modélisation de la croissance microbienne	69

4.1. Croissance microbienne en culture discontinue	69
4.2. Modélisation	71
4.2.1. Généralités (Meyer, 2004)	71
4.2.2. Modélisation des cinétiques de la croissance microbienne	73
4.2.3. Modélisation des interactions microbiennes	75
4.3. Conclusion	80
Chapitre II. Matériels et méthodes	82
1.1. Souches de bactéries et conditions de conservation	83
1.2. Milieux de cultures	83
2. Méthodes	84
2.1. Procédure pour les cultures	84
2.1.2. Cultures e conditions d'anaérobiose	85
2.1.2.1. Cultures en fioles d'Erlenmeyer	85
2.1.2.2. Cultures en Bio-Réacteur à Membrane	85
2.2. Méthodes analytiques	88
2.2.1. Mesure de biomasse	88
2.2.2. Dosages enzymatiques	89
2.2.2.1. Dosages de l'acide L-malique	89
2.2.2.2. Dosage de l'acide citrique	90
2.2.2.3. Dosage du glucose et du fructose	92
2.3. Calculs des paramètres cinétiques de la FML	92
Chapitre III. Résultats et discussions	95
1. Caractérisation de souches de bactéries lactiques <i>Cenococcus œni</i>	96
1.1. Cinétiques de croissances pour les différents milieux	96
1.1.1. Suivi de la croissance dans le milieu d'inoculum	96
1.1.2. Cinétiques de croissance dans le milieu de la FML en fioles d'Erlenmeyer	100
1.1.3. Cinétiques de croissance en condition anaérobie dans le BRM	101
1.1.4. Comparaison des croissances des souches pour les trois conditions	102
1.2. Cultures en conditions anaérobie : suivi des substrats	106
1.2.1. Consommations de glucose, fructose et d'acide citrique	106
1.2.2. Cinétiques de consommation d'acide L-malique	107
1.2.2.1. Dégradation de l'acide L-malique	107
1.2.2.2. Vitesses spécifiques de croissance et vitesses spécifiques de consommation d'acide L-malique	108
1.3. Lien croissance et consommation d'acide malique	111
1.3.1. Modélisation	111
1.3.2. Discussion sur le lien croissance et assimilation d'acide malique	114
1.4. Évaluation de l'effet de l'acide L-malique sur la croissance des souches	115
1.4.1. Effet sur les biomasses	116
1.4.1.1. Cultures en condition anaérobie	116
1.4.1.2. Cultures en condition de micro-aérobie	118
1.4.2. Analyses de l'effet sur les activités spécifiques μ et v	120
1.4.3. Consommation de l'acide citrique	122
1.5. Conclusion	124
2. Évaluation des cultures mixtes	126
2.1. Démarche d'évaluation des interactions	126

2.2. Interactions mises en évidence	128
2.2.1. Interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte	129
2.2.1.1. Couple A/B	129
2.2.1.2. Couple A/C	131
2.2.1.3. Couple A/D	134
2.2.1.4. Couple B/C	136
2.2.1.5. Couple B/D	138
2.2.1.6. Couple D/C	140
2.2.1.7. Conclusion	142
2.2.2. Interactions à effets négatifs sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effets positifs sur la croissance de la souche la plus lente.	143
2.2.2.1. Couple B/E	143
2.2.2.2. Couple C/E	145
2.2.2.3. Couple D/E	147
2.2.2.4. Conclusion	149
2.2.3. Interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure	149
2.2.3.1. Couple A/E	149
2.2.4. Récapitulatif des cultures mixtes	152
Conclusion générale et perspectives	156
Références bibliographiques	159
Annexes	168

Liste des figures

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Figure I. 1. Vinification en blanc et en rouge (Lai, 2010)	27
Figure I. 2. Schéma de la glycolyse	29
Figure I. 3. <i>Cenococcus œni</i> en paires et en chaînettes (Nehme, 2008)	34
Figure I. 4. Schéma de la fermentation du glucose par les bactéries hétérofermentaires selon la voie des pentoses-phosphates (Cavin et al., 1998)	36
Figure I. 5. Catabolisme du pyruvate chez les bactéries lactiques. ALS, α acétolactate synthase ; PFL, pyruvate formate lyase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; ADC, α acétolactate décarboxylase ; A/DR, acétoine et diacétyle réductase ; ODC, décarboxylation oxydative (Alexandre et al., 2008)	41
Figure I. 6. Différentes formes de l'anhydride sulfureux dans le vin	50
Figure I. 7. Exemple du test d'interaction levures/bactéries en milieu gélosé sur boîtes de Pétri (Taillandier et al., 2002)	64
Figure I. 8. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (en discontinu) décrites par Buchanan (1918).	71
Figure I. 9. Schéma simplifié des objectifs de la modélisation (Pommier, 2003)	72

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Figure II. 1. Bioréacteur à membranes pour l'étude de cultures mixtes de micro-organismes.	86
--	----

Chapitre III. Résultats et discussions

Figure III. 1. Croissances des inoculums des souches d' <i>C. œni</i> A, B, C, D et E en fioles d'Erlenmeyer (28°C ; pH 4,8 ; 5 % d'éthanol en conditions de micro-aérobie). Moyennes et écarts-types de 3 répétitions pour chaque souche.	97
Figure III. 2. Exemple de lissage des données expérimentales de biomasse : souche B en conditions d'inoculum.	99

<i>Figure III. 3. Exemple du profil de la vitesse spécifique de croissance (μ) de la souche d'CE. αeni B dans le milieu d'inoculum en fioles d'Erlenmeyer.</i>	99
<i>Figure III. 4. Croissance des souches A, B, C, D et E d'CE. αeni dans le milieu de fermentation FML en fioles d'Erlenmeyer (20°C ; pH 3,5 ; 10 % d'éthanol en condition de micro-aérobie).</i>	100
<i>Figure III. 5. Croissance des souches A, B, C, D et E d'CE. αeni dans le milieu de fermentation FML en BRM (20°C ; pH 3,5 ; 10 % d'éthanol en condition d'anaérobie).</i>	102
<i>Figure III. 6. Consommation d'acide L-malique des souches A, B, C, D et E d'CE. αeni dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.</i>	108
<i>Figure III. 7. Vitesse spécifique de croissance (μ) et vitesses spécifique de consommation d'acide L-malique des souches A, B, C, D et E d'CE. αeni dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.</i>	110
<i>Figure III. 8. Concentrations d'acide L-malique expérimentales et calculées durant les cultures des souches d'CE. αeni A, B, C, D et E en conditions d'anaérobie.</i>	113
<i>Figure III. 9. Croissance des souches A, B, C, D et E en fioles d'Erlenmeyer, en conditions d'anaérobie sous azote, en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation et évolution de leurs consommations d'acide L-malique (lorsqu'il est présent).</i>	117
<i>Figure III. 10. Croissance des souches D et E en fioles d'Erlenmeyer, en conditions de micro-aérobie en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation et évolution de la consommation d'acide L-malique en présence de celui-ci dans le milieu.</i>	119
<i>Figure III. 11. Évolution des vitesses spécifiques de croissances (μ) des souches A, B, C, D et E en condition d'anaérobie, en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation. Evolutions de leurs vitesses spécifiques de consommation d'acide L-malique.</i>	121
<i>Figure III. 12. Croissances des souches d'CE. αeni A et B en cultures pures et en culture mixte.</i>	130
<i>Figure III. 13. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'CE. αeni A et B en cultures pures et en culture mixte.</i>	130
<i>Figure III. 14. Consommation d'acide L-malique des souches A et B en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	131

<i>Figure III. 15. Croissances des souches d'œ. œni A et C en cultures pures et en culture mixte.</i>	132
<i>Figure III. 16. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. œni A et C en cultures pures et en culture mixte.</i>	133
<i>Figure III. 17. Consommation d'acide L-malique des souches A et C en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	134
<i>Figure III. 18. Croissances des souches d'œ. œni A et D en cultures pures et en culture mixte.</i>	135
<i>Figure III. 19. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. œni A et D en cultures pures et en culture mixte.</i>	135
<i>Figure III. 20. Consommation d'acide L-malique des souches A et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	136
<i>Figure III. 21. Croissances des souches d'œ. œni B et C en cultures pures et en culture mixte.</i>	137
<i>Figure III. 22. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. œni B et C en cultures pures et en culture mixte.</i>	137
<i>Figure III. 23. Consommation d'acide L-malique des souches B et C en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	138
<i>Figure III. 24. Croissances des souches d'œ. œni B et D en cultures pures et en culture mixte.</i>	139
<i>Figure III. 25. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. œni B et D en cultures pures et en culture mixte.</i>	139
<i>Figure III. 26. Consommation d'acide L-malique des souches B et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	140
<i>Figure III. 27. Croissances des souches d'œ. œni C et D en cultures pures et en culture mixte.</i>	141
<i>Figure III. 28. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. œni D et C en cultures pures et en culture mixte.</i>	141

<i>Figure III. 29. Consommation d'acide L-malique des souches C et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	142
<i>Figure III. 30. Croissances des souches d'œ. æni B et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	143
<i>Figure III. 31. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. æni B et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	144
<i>Figure III. 32. Consommation d'acide L-malique des souches B et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	144
<i>Figure III. 33. Croissances des souches d'œ. æni C et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	145
<i>Figure III. 34. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. æni C et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	146
<i>Figure III. 35. Consommation d'acide L-malique des souches C et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	146
<i>Figure III. 36. Croissances des souches d'œ. æni D et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	147
<i>Figure III. 37. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. æni D et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	148
<i>Figure III. 38. Consommation d'acide L-malique des souches D et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	148
<i>Figure III. 39. Croissances des souches d'œ. æni A et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	150
<i>Figure III. 40. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'œ. æni A et E en cultures pures et en culture mixte.</i>	151
<i>Figure III. 41. Consommation d'acide L-malique des souches A et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.</i>	152

Annexes

Figure 1. Concentrations en Unité Formant Colonie (UFC) en fonction de la densité optique DO_{620} de chacune des souches A, B, C, D et E. _____ 169

Liste des tableaux

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Tableau I. 1. Gènes putatifs de peptidases identifiés chez <i>C. œni</i> ATCC BAA-1163 avec les pourcentages d'identité (<i>id</i>) et de similarité (<i>sim</i>) des protéines déduites avec les protéines similaires de <i>L. lactis</i> (Alexandre et al., 2008).	38
Tableau I. 2. Comparaison des besoins en acides aminés de vingt souches d' <i>C. œni</i> (Alexandre et al., 2008)	43
Tableau I. 3. Facteurs influençant la croissance et la survie des bactéries (Nehme, 2008)	46
Tableau I. 4. Comparaison des méthodes d'étude des interactions microbiennes dans le cas de la FML en œnologie (Taillandier et al., 2002)	67

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Tableau II. 1. Caractéristiques du module fibres creuses de filtration du milieu de culture en BRM.	87
---	----

Chapitre III. Résultats et discussions

Tableau III. 1. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d' <i>C. œni</i> dans le milieu inoculum en fioles d'Erlenmeyer.	98
Tableau III. 2. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d' <i>C. œni</i> dans le milieu de fermentation FML en fioles d'Erlenmeyer.	101
Tableau III. 3. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d' <i>C. œni</i> dans le milieu de fermentation FML en BRM.	102
Tableau III. 4. Récapitulatif comparant les paramètres de croissances ; vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{max}), productivité totale (<i>P</i>) et productivité durant la phase de croissance (<i>Pg</i>) dans les différentes conditions de culture des souches d' <i>C. œni</i> A, B, C, D et E.	104
Tableau III. 5. Consommation de glucose, de fructose et d'acide citrique par les souches A, B, C, D et E dans le milieu de la FML en condition anaérobie.	107

<i>Tableau III. 6. Paramètres de consommation d'acide L-malique, des souches d'Œ. œni A, B, C, D, et E dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.</i>	<u>108</u>
<i>Tableau III. 7. Paramètres cinétiques du modèle proposé k_i et K_{mal}, des souches d'Œ. œni A, B, C, D, et E dans le milieu FML en condition anaérobie.</i>	<u>111</u>
<i>Tableau III. 8. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E en présence (+) et en absence (-) de l'acide malique dans le milieu de fermentation, en condition d'anaérobie.</i>	<u>118</u>
<i>Tableau III. 9. Paramètres de croissance des souches D et E, en présence (+) et en absence (-) de l'acide L-malique dans le milieu de fermentation, en condition de micro-aérobie.</i>	<u>120</u>
<i>Tableau III. 10. Consommation d'acide citrique des souches Œ. œni A, B, C, D et E en présence (+) et en absence (-) d'acide malique dans le milieu de fermentation, en condition d'anaérobie et de micro-aérobie.</i>	<u>123</u>
<i>Tableau III. 11. Récapitulatif des résultats des cultures mixtes.</i>	<u>153</u>

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AB : amine biogène

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BRM : Bio-Réacteur à Membrane

°C : degré celsius

Da : dalton

DO : densité optique

EML : enzyme malo-lactique

FA : fermentation alcoolique

FML : fermentation malo-lactique

g : gramme

h : heure

L : litre

Min : minutes

mmole : millimole

µm : micromètre

nm : nanomètre

MRS : Man Rogosa Sharpe

NAD : nicotinamide adénine diphosphate

Æ. æni : *Ænococcus æni*

QS : quorum sensing

P : productivité

pH : potentiel d'hydrogène

% : pourcentage

® : Marque déposée

rpm : révolution par minute

S.cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

sod : superoxide dismutase

UFC : Unité Formant Colonie

v/v : volume par volume

μ : vitesse spécifique de croissance

v : vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique

Introduction générale

Introduction générale

A l'heure actuelle, la majorité des denrées alimentaires subissent des transformations avant leurs arrivées chez le consommateur par des procédés bien adaptés comme dans les secteurs de la laiterie, la fromagerie, la brasserie, la sucrerie...etc. Une grande partie de ces procédés alimentaires fait intervenir des micro-organismes (levure(s) et/ou bactérie(s)). Au-delà de ces aliments qui ont été en contact avec des flores ajoutées et/ ou développées intentionnellement, tout ce que nous consommons contient et/ou a été en contact avec des micro-organismes.

Les bio-procédés alimentaires sont en général des procédés dans lesquels des micro-organismes sont ajoutés ou sont présents sur la matière première, en vue d'obtenir un produit fini avec des caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sanitaires satisfaisantes. La maîtrise de ces procédés faisant intervenir des micro-organismes nécessite, bien évidemment, de bien connaître ces êtres vivants et de connaître leurs réactions envers leurs environnements (connaissances génétiques, physicochimiques et physiologiques...etc.).

Le vin est une boisson fermentée obtenue, en général, après deux fermentations qui sont découplées dans le temps, ce sont la fermentation alcoolique (FA) réalisée par les levures et la fermentation malo-lactique (FML) réalisée par les bactéries lactiques, principalement *Enococcus* (*CE*) *æni*. La FA demeure mieux gérable par les vinificateurs par rapport à la FML. Ceci en raison des connaissances acquises sur les levures beaucoup plus abondantes comparées aux avancées scientifiques sur les bactéries du vin. En effet, ces dernières étaient au départ négligées et considérées comme nuisibles, altérant la qualité de la boisson. C'est ce que Pasteur appelait 'la maladie du vin'. Ces 20 dernières années, les spécialistes de la fermentation des vins ont pris conscience des rôles critiques que la FML jouait sur la qualité du vin, et en particulier *CE. æni* comme le rapporte Alexandre et al. (2008).

Malgré ces efforts, le vinificateur n'est pas encore toujours apte à bien contrôler la FML, parce que le comportement d'*CE. æni* n'est pas encore bien connu. Notamment, la majorité des études ont été réalisées uniquement sur les cultures pures des souches de cette bactérie. Or, dans les milieux réels elle ne se retrouve sûrement pas toute seule ; dans le moût de raisin on trouve par exemple les Lactobacilles, les Pédicocoques, les levures et différentes souches d'*CE*.

œni elle-même. La focalisation des recherches sur les cultures pures est justifiée par les difficultés expérimentales liées aux cultures mixtes. Il est difficile de quantifier et de suivre les biomasses de chacune des souches en cultures mixtes et aussi difficile de doser l'agent inhibiteur ou stimulateur d'une telle interaction.

Notre travail de thèse s'inscrit dans le contexte du projet ANR DIVOENI d'étude de la biodiversité intra-spécifique chez l'espèce *CE. œni*. Ce projet de recherche vise à évaluer, préserver et mieux utiliser cette bactérie lactique du vin. Il s'agit en effet d'exploiter la biodiversité des bactéries lactiques et de sélectionner celles qui semblent les plus adaptées parmi des centaines isolées de vins d'origines différentes. Pour cela il faut tester les *CE. œni* sélectionnées et étudier leurs comportements dans un environnement complexe (vin ou milieu simulé vin).

Dans ce cadre le travail présenté dans ce manuscrit a pour objectif d'apporter une contribution à l'étude des interactions entre différents couples de cinq souches d'*CE. œni* en cultures mixtes. Le recueil des données expérimentales devrait permettre de mettre en évidence les différents types d'interactions qui peuvent être observées entre un couple de souches *CE. œni*. Ces couples modèles peuvent représenter une souche sélectionnée contre une population autochtone par exemple.

L'outil choisi est le Bio-Réacteur à Membrane (BRM) qui a été développé au Laboratoire de Génie Chimique pour l'étude des cultures mixtes (Salgado et al., 1999). Cet appareillage semble le mieux adapté pour l'évaluation des interactions indirectes entre micro-organismes. En effet, le BRM permet la quantification des biomasses de chacune de 2 souches microbiennes en culture mixte dans le même milieu de culture. Il a été utilisé dans plusieurs études de cultures mixtes de couples de micro-organismes du vin : *Saccharomyces/Saccharomyces* (Pommier, 2003), *Saccharomyces/Torulaspora* (Lai, 2010), levure *Saccharomyces/CE. œni* (Nehmé, 2008) et une étude pour le couple *CE. œni/CE. œni* (Tataridis, 2001).

Le chapitre I de ce manuscrit est rédigé dans le souci de synthétiser des données bibliographiques. Des généralités sur la vinification et les facteurs influençant ce procédé seront présentées en premier lieu. Cette première partie permettra aussi de connaître *CE. œni*, son métabolisme et son rôle dans le vin. En second lieu, nous exposerons les différents types d'interactions qui peuvent exister entre micro-organismes, et en dernier lieu, une partie de ce chapitre sera consacrée à la modélisation de la croissance microbienne.

Le chapitre II regroupe l'ensemble des techniques et méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail.

Les résultats de nos expériences associées aux discussions sont exposés dans le chapitre III en 2 parties. La première partie traite de la caractérisation de 5 souches de bactéries lactiques *CE. æni*. D'abord, sera présentée la comparaison du développement des souches dans des conditions de culture (pH, température, éthanol et micro-aérobie/anaérobie) à différents niveaux de stress. Ensuite, la modélisation mathématique des cinétiques des cultures pures sera abordée. Enfin, seront présentés et discutés dans cette première partie les résultats d'évaluation de l'effet de l'acide malique sur la croissance des souches étudiées. La deuxième partie porte sur l'étude des interactions. Elle exploite et analyse les données expérimentales des cultures mixtes des couples de souches d'*CE. æni*. Les différents types d'interactions sont alors mis en évidence par comparaison de l'activité de chaque souche en culture pure avec son activité en culture mixte.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Vinification

La vinification est l'ensemble des opérations qui permettent l'élaboration d'un vin. Selon la définition légale du vin en Europe « *le vin est le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins* ». La fabrication du vin fait intervenir des levures et des bactéries lactiques. Celles-ci effectuent, respectivement, la fermentation alcoolique et la fermentation malo-lactique.

Le processus de vinification va être différent suivant le type de vin souhaité (blanc, rouge, rosé) et les choix du maître de chai Ribéreau-Gayon et *al.* (1998). Les grandes étapes sont décrites ci-dessous (figure 1.1)

1.1. Opérations de pré-fermentation

Réception de la vendange

Les grappes de raisin récoltées sont transportées au chai et habituellement réceptionnées dans une cuve en forme d'entonnoir. Afin de s'assurer de la qualité de la vendange, les raisins doivent être au stade optimal de la maturité et dans un parfait état sanitaire. Pour avoir dans son jeu tous les atouts de la réussite, le vinificateur doit disposer de raisins entiers qui n'ont pas été écrasés lors de la cueillette et du transport en vue d'éviter tout début de macération et d'oxydation.

Éraflage

L'éraflage (ou l'égrappage) a pour but de séparer les grains des rafles, charpentes végétales qui soutiennent les grains. Il est facultatif mais fréquent et est réalisé lorsque la macération dure longtemps. Cette opération permet de limiter les goûts herbacés dans le vin, et d'obtenir des vins moins astringents.

Fouillage (vinification en rouge)

L'opération consiste à faire éclater les grains de raisins de manière douce pour faire jaillir le jus et préparer le pressurage en facilitant l'extraction des moûts. Elle libère ainsi le jus contenu dans les baies. Pendant cette opération, la vendange s'homogénéise et s'aère. Le moût est composé de jus, de peaux, de pulpe et de pépins. Autrefois réalisée pieds nus, cette opération est aujourd'hui mécanisée pour la plupart des vinifications.

Pressurage

Le pressurage permet l'extraction par pression du jus des grappes. C'est à ce stade que se fait toute la différence entre l'élaboration d'un vin blanc et d'un vin rouge. Pour un vin rouge le pressurage intervient après la fermentation alors que pour un vin blanc il intervient avant.

Sulfitage

Le sulfitage est aussi une opération pré-fermentaire commune à tous les types de vinifications. On appelle ainsi l'addition d'anhydride sulfureux (SO_2). La vendange reçoit une dose de soufre mesurée pour permettre d'assurer la stabilité microbienne et chimique du vin. En effet le SO_2 est un antioxydant et antibactérien. Il permet d'éliminer les bactéries et les micro-organismes indésirables pour permettre un bon déroulement de la FA.

Il existe différents types de vinifications : la vinification en rouge, en blanc, en rosé ou en vins effervescents. Les opérations faisant suite aux étapes de pré-fermentation diffèrent selon le type de vin désiré. Nous présentons, dans le paragraphe qui suit, les étapes dans le cas de la vinification en rouge (Figure I.1).

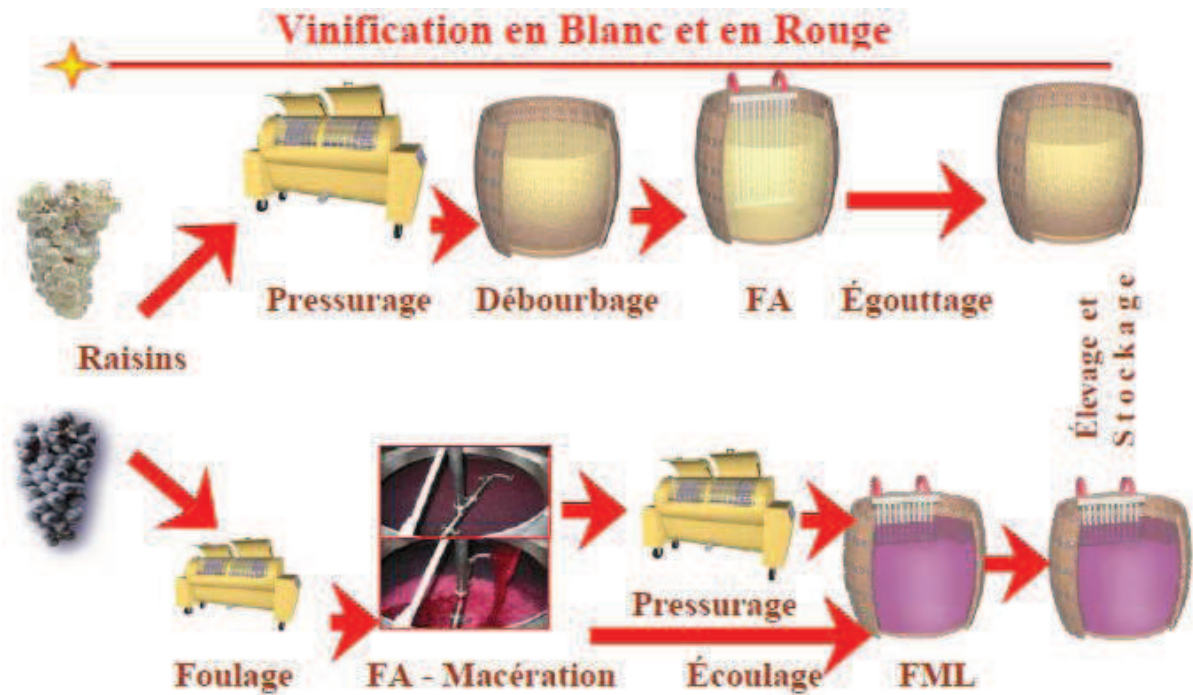
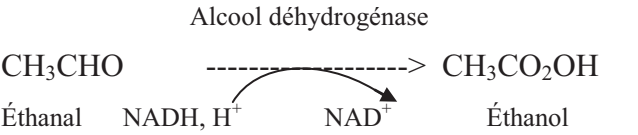
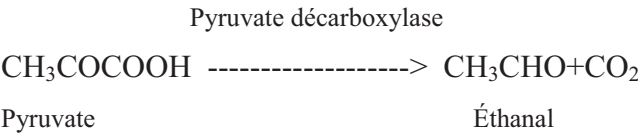


Figure I. 1. Vinification en blanc et en rouge (Lai, 2010)

1.2. Fermentation alcoolique et macération

Les sucres du jus (glucose et fructose), avant de subir la fermentation proprement dite, sont métabolisés principalement suivant la voie de la glycolyse (Figure I.2) par les levures. Il s'agit des réactions qui transforment le glucose en pyruvate et qui libèrent de l'énergie utilisable par les cellules (gain de 2 molécules d'ATP et de 2 molécules de NADH, H⁺). Le fructose rejoint cette voie par phosphorylation pour donner le fructose-6-phosphate. En anaérobiose, les levures continuent le catabolisme de l'acide pyruvique en éthanol : c'est la fermentation alcoolique. En effet, l'éthanol est obtenu à partir du pyruvate selon les 2 réactions suivantes :



À partir de ces réactions fermentaires, la levure effectue le recyclage d'une molécule NAD^+ réutilisée pour la réalisation de la glycolyse. Quand il y a une forte croissance de la levure, en présence d'oxygène notamment, et que le jus de raisin est très sucré en début de fermentation, une autre voie de recyclage du NADH_2 est favorisée. Il s'agit de la fermentation glycéropyruvique qui produit du glycérol. Celui-ci contribue aux qualités organoleptiques du vin.

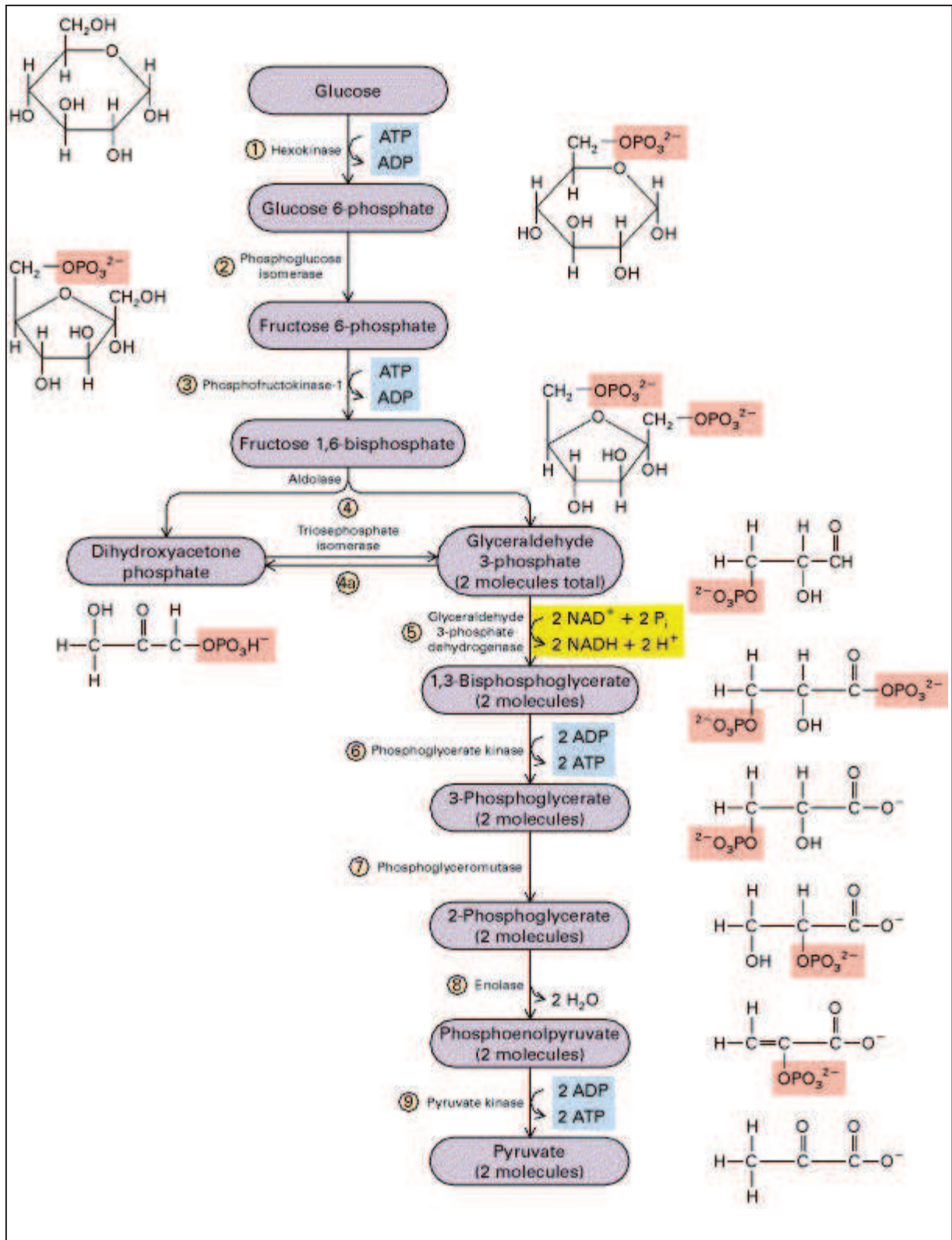


Figure I. 2. Schéma de la glycolyse

1.3. Spécificités de la vinification en rouge

Les deux opérations, fermentation alcoolique (FA) et macération sont simultanées et essentielles pour le vin. Elles ont lieu dans la cuve où la vendange a été mise après les opérations de pré-fermentation. Au cours de la fermentation alcoolique (cf. § 1.2), on peut distinguer deux phases : le jus et le marc. Le marc est une masse compacte formée de la peau, de la pulpe, des pépins et de quelques morceaux de rafles. Cela forme un chapeau au-dessus du jus. La FA dure environ quatre à dix jours. Elle est terminée lorsqu'il n'y a plus de sucres fermentescibles. Les facteurs physico-chimiques principaux influençant la durée et le déroulement de la FA sont : la température qui doit être entre 20 et 30 °C, l'aération du moût, la concentration en éthanol, la teneur en azote assimilable, les acides gras...etc.

Le marc contient des anthocyanes et des tanins qui permettront de donner la couleur et la structure au vin. Pendant la macération, des remontages sont réalisés, pratique qui consiste à prélever le jus en bas de cuve et le verser sur le marc. Ainsi, le jus passant au travers de ce chapeau s'enrichit progressivement de toutes les substances colorantes et des tanins. Cette opération permet aussi d'aérer le moût afin de permettre un meilleur développement de la levure. Les matières colorantes du moût sont essentiellement extraites en début de fermentation alcoolique (phase aqueuse) alors que les tanins sont plutôt extraits en fin de fermentation (l'alcool permet la meilleure extraction des tanins).

L'écoulage permet d'égoutter la partie liquide de la cuve généralement par ouverture d'un robinet placé en bas de cuve. C'est le vin de goutte.

Le décuvage consiste à extraire les marcs restés dans la cuve après écoulement.

Le pressurage permet l'extraction du vin par pression du marc. C'est le vin de presse, très riche en tanins, en couleur et en alcool. Le vin de goutte et le vin de presse sont mis séparément dans des cuves d'achèvement ou dans des fûts en chêne.

1.4. Fermentation malo-lactique (FML)

C'est une seconde fermentation qui désacidifie le vin et entraîne la formation de nouvelles saveurs et arômes. Nous reviendrons plus largement sur cette étape dans le paragraphe 2 de ce chapitre.

1.5. Opérations post-fermentaires

Débourbage et clarification

Au terme de la FML, le vin est centrifugé ou laissé en décantation. Le vin clair est alors séparé des bourbes (résidus, débris solides de pulpe, levures et bactéries mortes). Ce premier soutirage permet d'aérer le vin et le clarifier.

Opérations d'assemblage, d'élevage et de conservation

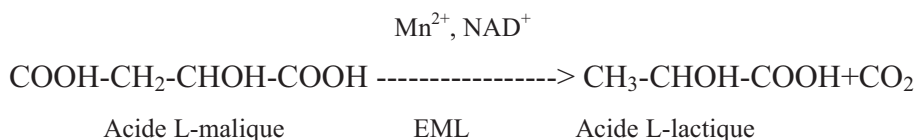
A ce stade l'œnologue décide de l'opération d'assemblage des vins obtenus (vin de goutte, vin de presse...etc.) sur la base de tests organoleptiques. Généralement, une certaine quantité du vin de presse est ajoutée au vin de goutte pour lui apporter de la structure.

L'élevage du vin est une lente maturation qui peut durer jusqu'à 18 mois en barriques. Le vin est ensuite soutiré par transvasements successifs afin de le séparer des dépôts accumulés dans le fût (la lie). Il est ensuite clarifié par « collage » au blanc d'œufs ou avec d'autres substances riches en protéines pour les vins rouges et par de la bentonite pour les vins blancs, puis éventuellement filtré avant d'être mis en bouteilles pour le conserver.

2. Fermentation Malo-Lactique

La fermentation malolactique est généralement consécutive à la fermentation alcoolique. Les nombreux travaux scientifiques autour des levures réalisés sur les 50 dernières années, et l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* notamment, ont permis de mieux maîtriser la fermentation alcoolique et de faire des progrès considérables dans les domaines d'applications des levures. En ce qui concerne les bactéries lactiques du vin, ce n'est que plus récemment que les scientifiques s'y sont intéressés. Pourtant, la FML n'est pas toujours maîtrisée malgré son impact important sur le produit fini.

En effet, l'importance de la FML n'a été découverte qu'à partir des années 1920, et ce malgré les progrès de la microbiologie depuis les découvertes de Pasteur en 1857. De nos jours, la fermentation malolactique (FML) est devenue une étape critique dans l'élaboration des vins. La réaction de décarboxylation de l'acide malique en présence d'ions manganèse (Mn^{2+}) et de NAD^+ comme cofacteurs par l'enzyme Malo-Lactique entraîne la production d'acide lactique et le dégagement de CO_2 :



Cette réaction est réalisée par *Æ. œni* dans les vins rouges et dans certains vins blancs comme le Champagne. Elle est également réalisable par *Lactobacillus*. La FML permet de :

- diminuer l'acidité afin de produire un vin souple et moins agressif gustativement
- avoir une meilleure stabilité microbiologique
- produire un caractère organoleptique plus complexe par formation de certaines molécules aromatiques : modification de la couleur, de la saveur et de l'arôme.

Outre ces qualités qu'*Æ. œni* confère aux vins, la maîtrise de la FML a une haute importance économique d'après Renouf (2008). En effet, le moment du déclenchement de la FML et sa durée affectent nettement les rendements du procédé : plus la FML a du mal à démarrer plus elle peine à s'achever et donc plus les coûts s'alourdissent.

Par conséquent, pour mieux maîtriser cette étape, il est nécessaire d'une part d'assurer les conditions optimales de croissance pour *Æ. æni* et d'autre part, de sélectionner les souches les plus adaptées.

Les paramètres physico-chimiques de croissance comme le pH et la température sont actuellement mieux définis et maîtrisés, mais la composition en nutriments dépend fortement de la qualité du raisin, du cépage et des conditions climatiques. En ce qui concerne la sélection des souches, les performances de celles utilisées industriellement sont connues pour des conditions standards mais il s'avère que pour certaines elles ne parviennent pas à réaliser correctement la FML. L'interaction avec des flores indigènes peut être une des explications.

Dans les sous-paragraphes qui suivent, nous présenterons d'abord l'espèce microbienne *Ænococcus æni*, agent principal de la FML en œnologie, du point de vue de son métabolisme, d'éléments génétiques et de ses besoins nutritionnels. Puis nous exposerons les facteurs qui influencent la FML.

2.1. Espèce *Ænococcus æni*

2.1.1. Caractéristiques et taxonomie

Parmi les bactéries lactiques, les plus fréquentes en œnologie sont les genres *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Ænococcus* et *Lactobacillus*. *Ænococcus æni* est la seule espèce du genre *Ænococcus*. Cette classification est effectuée grâce aux récents outils de la biologie moléculaire ; à savoir le pourcentage en nucléotides G et C de l'ADN, l'hybridation des sondes ADN-ADN, la structure et la séquence des ARNr (Lonvaud Funel et *al.* 2010).

Æ. æni, anciennement nommée *Leuconostoc oenos* (Dicks et *al.*, 1995), est une bactérie lactique Gram positive. Elle a les caractéristiques suivantes : petites cellules de forme arrondie ou légèrement allongée formant des paires ou des chaînettes (Figure I.3), non mobile, ne formant pas de spores, acidophile, catalase négatif et chimio-organotrophe. Elle est mésophile (20 à 30 °C), sa croissance est optimale à pH 4,8 et elle est anaérobie facultative.



Figure I. 3. *Enococcus oeni* en paires et en chaînettes

Chez *Æ. oeni*, seul le mode de reproduction par scissiparité est observé. Le chromosome de la cellule est répliqué, par la suite la cellule se divise en deux pour donner 2 cellules filles similaires.

Cette bactérie est rarement retrouvée sur les baies de raisin. Elle a été détectée uniquement une fois en fin de véraison (Renouf et *al.*, 2005). Il a été supposé que, sur les baies, *Æ. oeni* est probablement inhibée par d'autres souches telles que *Lb. lindneri*, *Lb. Kunkeei* et *Lb. Lactis* par production de bactériocines. La présence d'*Æ. oeni* dans le moût de raisin viendrait principalement du matériel vinaire (Alexandre et *al.*, 2008).

Æ. oeni est la bactérie lactique la plus apte à résister et à se développer après la fermentation alcoolique en conditions œnologiques.

2.1.2. Métabolisme et éléments génétiques chez *Enococcus oeni*

➤ Glucides et composés azotés

Chez les bactéries lactiques, les Pédiocoques et certains Lactobacilles métabolisent les sucres selon la voie homofermentaire : le pyruvate obtenu par la glycolyse est transformé principalement en acide lactique (90%). Les genres *Enococcus*, *Leuconostoc* et certains Lactobacilles sont par contre des bactéries hétéro-fermentaires car elles ne possèdent pas l'aldolase de la voie de la glycolyse. Cela signifie qu'elles métabolisent le glucose via la voie des pentoses phosphates (Figure I.4). Les produits de cette voie sont l'acide lactique (produit majoritaire, de l'ordre de 50%), l'éthanol, l'acétate et le CO₂.

L'enzyme clé de la voie des pentoses-phosphates est la phosphocetolase qui produit à partir du xylose-5-P, du glycéraldéhyde-3-P et de l'acétyl-P et du CO₂. Le glycéraldéhyde-3-P

rejoint la voie que l'on retrouve dans la glycolyse et donne du pyruvate puis de l'acide lactique. L'acétyl-P est réduit en acétate ou éthanol via l'acétyl-coA (figure I.4).

Le bilan de cette fermentation est le suivant :



Les bactéries lactiques hétéro-fermentaires génèrent à partir du glucose 1 mole d'ATP et 3 moles de NADH. Une mole de coenzyme est réoxydée au niveau du pyruvate via la Lactate Déshydrogénase (LDH) et les deux autres moles de NADH sont réoxydées au niveau de l'acétyl-CoA et de l'acétaldéhyde. Le fructose présent dans le milieu est également dégradé par la voie hétérofermentaire. Cependant, il peut jouer le rôle d'accepteurs d'électrons pour la réoxydation du NADH produit, puisque la réduction du fructose en mannitol par la mannitol déshydrogénase permet la réoxydation des coenzymes réduits. Dans ce cas, l'acétyl-P est transformé préférentiellement en acétate, avec un gain supplémentaire en ATP. Cela explique le meilleur rendement de croissance d'*CE. œni* dans un milieu où il y a un mélange de glucose et de fructose. Bien que le manuel 'Bergey's Manual of determinative bacteriology (Holt et al. 1994)' affirme que le glucose est fermenté par le genre *Leuconostoc*, *CE. œni* présente une préférence pour le fructose par rapport au glucose (Lonvaud-funel et al., 2010). Selon ces auteurs, contrairement à la fermentation du glucose seul, on obtient une meilleure croissance de *CE. œni* lorsque elle fermente les 2 hexoses en mélange, glucose et fructose, ou bien du fructose seul.

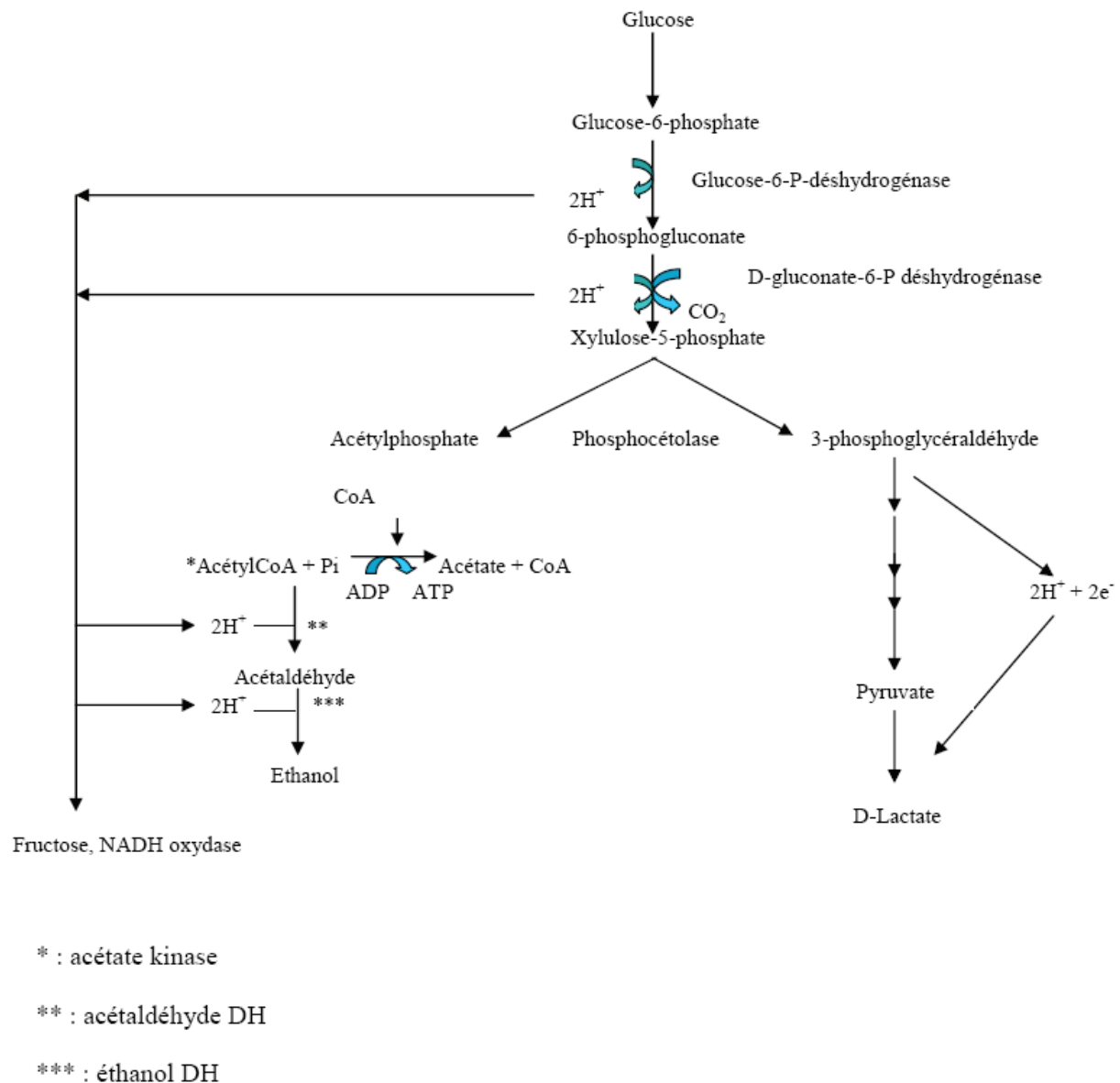


Figure I. 4. Schéma de la fermentation du glucose par les bactéries hétérofermentaires selon la voie des pentoses-phosphates (Cavin et al., 1998)

La bactérie *CE. æni* possède les systèmes enzymatiques extracellulaires nécessaires pour le catabolisme des polysaccharides (l'enzyme β (1-3) glucanase a été retrouvé chez *CE. æni*) et pour la dégradation des protéines. C'est une bactérie chimio-organotrophe, elle n'assimile donc pas de l'azote minéral et a besoin de l'azote organique. Il a été démontré que les protéases de cette bactérie sont capables d'hydrolyser les protéines du vin et des levures et d'assimiler des dipeptides et des oligopeptides. L'analyse des génomes d'*CE. æni* n'a pas

permis d'identifier de gène similaire à des protéases d'autres bactéries lactiques telle que le *Prtp* de *L. lactis* (Allexandre et *al.*, 2008).

La souche *Æ. æni* ATCC BAA 1163 a la capacité de synthétiser une protéase d'environ 21 kDa dans un milieu pauvre en azote (Remise et *al.*, 2005). Cette protéine a été purifiée et caractérisée : elle a la propriété d'hydrolyser des protéines sur une gamme de pH de 4,5 à 7,6. En milieu riche, cette protéase est produite mais uniquement en phase stationnaire. Il semble donc que sa production soit une réponse à des conditions défavorables.

Etude génomique

Le génome de la souche ATCC BAA 1163 a permis d'identifier 27 gènes putatifs de peptidases qui pourraient avoir un rôle dans l'assimilation des peptides (Tableau I.1). Il a été conclu d'après ces études génomiques et des tests d'activités peptidasiques que cette souche présente des particularités par rapport aux bactéries lactiques du lait *L. lactis*, streptocoques et lactobacilles : protéases extracellulaires multiples et différentes, multiplicité de protéines de fixation pour les transporteurs, faible activité aminopeptidasique générale et activité majoritaire de propyl-amino-peptidase pour les peptides à proline. Il semble donc normal qu'il y ait une différence entre cette souche ATCC BAA 1163 et la bactérie lactique du lait *L. lactis*, puisque les protéines cibles à métaboliser sont également différentes.

Des études ont montré que le génome de la souche *Æ. æni* PSU-1 présente des gènes codant potentiellement des transporteurs de sucres, à savoir le système ABS, les systèmes PTS et les systèmes de symport sucre/H⁺ (Mills et *al.*, 2005).

Il a été trouvé que la souche PSU-1 présente des gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse de 8 acides aminés : alanine, aspartate, asparagine, cystéine, glutamine, lysine, méthionine et thréonine (Makarova et *al.*, 2006). La capacité anabolique de l'espèce *Æ. æni* vis-à-vis de ces acides aminés a été également confirmée. Cependant, des gènes codant la synthèse de certains acides aminés sont absents chez certaines souches d'*Æ. æni* séquencées. Ceci s'explique par le fait qu'il peut y avoir une perte de gène au cours de l'évolution, en réponse à la pression environnementale (Allexandre et *al.*, 2008).

Tableau I. 1. Gènes putatifs de peptidases identifiés chez *Æ. œni* ATCC BAA-1163 avec les pourcentages d'identité (id) et de similarité (sim) des protéines déduites avec les protéines similaires de *L. lactis* (Alexandre et al., 2008).

		% id / sim <i>L. lactis</i>
Aminopeptidases générales		
PepN	Aminopeptidase N	50,1 / 68,5
PepC1	Cystéine aminopeptidase C	48,0 / 67,6
PepC2	Cystéine aminopeptidase C	38,8 / 57,4
Aminopeptidases spécifiques à proline		
PepX	X-pro dipeptidyl peptidase	32,8 / 53,0
PepI1	Prolyl aminopeptidase	–
PepI2	Prolyl aminopeptidase	–
PepI3	Prolyl aminopeptidase	–
Di- et tripeptidase		
PepT	Tripeptidase	49,5 / 68,4
PepD	Dipeptidase	46,5 / 64,7
PepV1	Dipeptidase	43,1 / 63,5
PepV2	Dipeptidase	32,9 / 48,8
PepQ	Proline dipeptidase	46,9 / 66,8
PepP	Xaa-pro dipeptidase	39,0 / 56,3
Endopeptidases		
PepF1	Oligoendopeptidase F	44,3 / 64,2
PepF2	Oligoendopeptidase F	20,2 / 41,4
PepF3	Oligoendopeptidase F	21,6 / 43,3
PepO	Endopeptidase O	39,8 / 58,6
Peptidases faiblement caractérisées		
YmfH	Peptidase M16	30,8 / 48,5
YueF	Zn protéase	24,2 / 47,7
YuxL	Peptidase YuxL	–
DmpA	L-aminopeptidase/D-esterase	–
CDS_23454_24602_C	Peptidase M20/M25/M40 family A	47,8 / 63,4
CDS_100542_101903_C	Peptidase M20/M25/M40 family B	–

Métabolites issus des acides aminés

Des souches d'*CE. œni* sont capables de métaboliser la méthionine pour former des composés soufrés volatils dans le vin, avec des quantités significatives. Ce sont en particulier le 3-(méthylsulphanyl) propan-1-al, le 3-(méthylsulphanyl) propan-1-ol et l'acide 3-(méthylsulphanyl) propionique. D'après Pripis-Nicolau *et al.* (2004), seul ce dernier pourrait avoir un impact sur la perception aromatique après la fermentation du vin.

Plusieurs études montrent qu'il peut y avoir production d'amines biogènes (AB) par les bactéries lactiques à partir des acides aminés. Les AB nuisent à la qualité sanitaire des produits alimentaires mais à l'heure actuelle, il n'y a pas d'étude démontrant leurs effets sur la croissance des bactéries *CE. œni* ni sur l'activité malo-lactique.

La production d'amines biogènes, putrescine et cadavérine, a été montrée chez plusieurs souches d'*CE. œni* parmi 44 testées isolées de vins italiens (Guerrini *et al.*, 2002). Rosi *et al.* (2008) ont identifiés de l'histamine et de la tyramine produite par deux souches d'*CE. œni* (261 et 351). Leur production dépend de la composition du milieu, de la souche de levure utilisée, et du temps de contact entre les bactéries et les levures après la FML.

L'effet de l'éthanol, du malate et de l'arginine sur la production de l'histamine par *Lactobacillus hilgardii* a été évalué par Mazzoli *et al.* (2008). Une concentration d'éthanol supérieure à 13 % inhibe l'accumulation de l'histamine et la croissance bactérienne ; et des concentrations inférieures à 9 % n'affectent ni la croissance ni l'accumulation de l'histamine. Cependant une concentration de 11 % permet une faible accumulation de l'histamine qui se produit en continu. L'arginine retarde aussi l'accumulation de l'histamine alors que le malate apparaît sans effet sur la conversion de l'histidine en histamine.

➤ **Acides organiques**

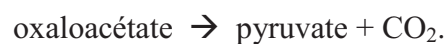
En plus des glucides et des matières azotées, *CE. œni* métabolise des acides organiques. En effet le jus de raisin contient de l'acide malique, de l'acide citrique et de l'acide tartrique.

Le transport du L-malate vers le milieu intracellulaire d'*CE. œni* fait intervenir une perméase spécifique des formes anionique de l'acide (Salema *et al.*, 1994). Le L-malate rentre selon un uniport sous forme mono-anionique suivi de la diffusion vers l'extérieur de l'acide lactique et du CO₂.

Le transport du L-malate et du citrate est fortement inhibé par le potentiel de membrane (négatif à l'intérieur) alors que l'accumulation du L-malate et du citrate à l'intérieur de la cellule est favorisée par le gradient de pH (Ramos *et al.*, 1994 et Salema *et al.*, 1994).

Les gènes codant le transporteur du L-malate et de l'enzyme malolactique (EML) ont été identifiés et sont respectivement *mleP* et *mleA* (Alexandre *et al.*, 2008). Selon Augagneur (2007), lors de la croissance d'*Æ. œni* à pH 4,5 ou pH 3,2 une augmentation de la synthèse de l'ARNm de *mleP* codant le transporteur du malate est induite par la présence du malate dans le milieu. D'autres travaux confirment que pour la plupart des souches étudiées l'EML est induite par la présence du L-malate (Alexandre *et al.*, 2008). Ceci a été également montré plus récemment chez *Lactobacillus Plantarum* (Miller *et al.*, 2011)

De même, le transport du citrate est catalysé par un uniport et est transporté sous forme mono-anionique. Chez *Æ. œni*, Salema *et al.* (1994) suggèrent qu'il y a possibilité d'existence du même mécanisme de transport du citrate et du malate, voire que ce soit un transporteur unique. A l'intérieur de la cellule, l'acide citrique, est dans un premier temps catabolisé par le système citrate lyase qui produit de l'oxaloacétate et de l'acétate. Ensuite l'oxaloacétate peut être décarboxylé par l'oxaloacétate décarboxylase pour donner du pyruvate selon la réaction suivante :



Chez *Æ. œni* le citrate est un précurseur dans la biosynthèse des acides aminés dérivés de l'aspartate, l'asparagine et l'isoleucine (Saguir et Manca de Nadra, 1997 ; Saguir et Manca de Nadra, 2002) et l'aspartate a un effet stimulateur de la croissance. Ramos *et al.* (1995) en utilisant la RMN ¹³C ont identifié l'aspartate comme le produit du métabolisme du citrate chez *Leuconostoc œnos* isolée à partir du vin. En effet, en plus de la voie de la biosynthèse des acides aminés évoquée l'acide citrique peut suivre 3 autres voies métaboliques possibles (Renouf et Murat. 2010) : 1) production de diacétyle et d'autres molécules acétonoïques pour éliminer le pyruvate en excès et réguler le pH intracellulaire. 2) synthèse des lipides exploités pour la biosynthèse des phospholipides membranaire. 3) production de l'acide acétique avec libération d'une molécule de phosphate utile pour la génération de la molécule d'ATP (Figure 1.5).

L'utilisation de chacune des différentes voies par les bactéries dépend des conditions du milieu, et dépend également de l'aptitude physiologique des souches à tolérer les conditions de stress.

Les auteurs Renouf et Murat (2010) ont également constaté que la consommation d'environ 0,28 g.L⁻¹ d'acide citrique, dans un vin de chardonnay inoculé en bactéries sélectionnées après la fermentation alcoolique, s'effectue entre l'inoculation et l'enclenchement de la FML. La comparaison d'un levain malo-lactique conventionnel avec un levain incapable de dégrader l'acide citrique a montré que celui-ci a connu une phase de latence de la FML deux fois plus importante que le levain conventionnel. Par ailleurs, Du Toit et *al.* (2010) rapportent que plusieurs études montrent que le métabolisme de l'acide citrique est susceptible de survenir après la dégradation de l'acide malique. En effet, il a été découvert que la présence d'acide malique inhibe le transport d'acide citrique (Martineau et Henick-Kling, 1996) et réduit l'activité du citrate lyase (Nielsen et Richelieu, 1998).

En corollaire, les concentrations en malate et en citrate dans le vin constituent des éléments favorisant une bonne croissance de la bactérie et donc une bonne conduite de la FML, puisque ils ont un effet stimulateur de la croissance. Ceci amène à s'intéresser à l'amont de la filière de vinification : les caractéristiques du moût découlant de la qualité du raisin, du moment de la récolte, de la qualité du cépage..etc.

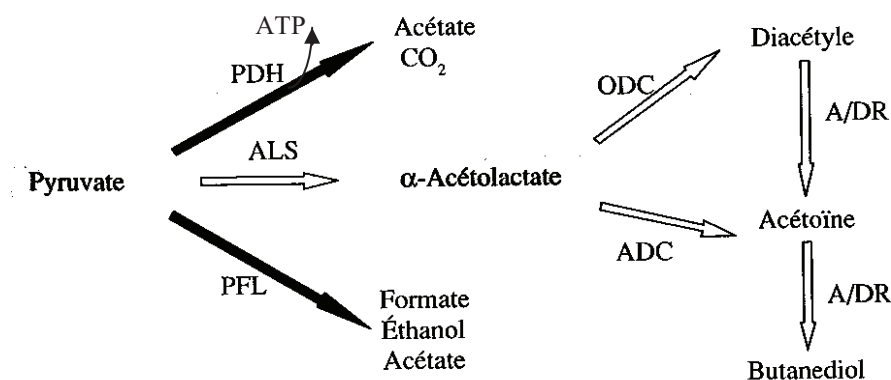


Figure I. 5. Catabolisme du pyruvate chez les bactéries lactiques. ALS, α acétolactate synthase ; PFL, pyruvate formate lyase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; ADC, α acétolactate décarboxylase ; A/DR, acétoïne et diacétyle réductase ; ODC, décarboxylation oxydative (Alexandre et al., 2008)

En ce qui concerne l'acide tartrique, celui-ci n'est généralement pas métabolisé par les bactéries lactiques.

2.1.3. Besoins nutritionnels

❖ Besoins en sources de carbone

C. œni utilise le glucose et le fructose qui sont présents dans le vin. Elle se développe mieux sur un milieu contenant les 2 glucides que sur un milieu contenant le glucose seul grâce au gain d'énergie provoqué par la réoxydation des coenzymes NADH, H⁺ (cf. métabolisme des glucides en § 2.1.2).

Pour la croissance des bactéries lactiques présentes dans le vin, une concentration de glucose inférieure à 1 g.L⁻¹ est suffisante. En outre, la limitation du développement des bactéries lactiques n'est généralement pas due aux sources de carbone. Des études ont montré qu'à côté du glucose et du fructose, *C. œni* utilise le mannose le tréhalose, et selon les souches, le galactose, l'arabinose, le ribose et le xylulose (Lonvaud-Funel et al., 2010).

Nous avons vu qu'*C. œni* présente une activité glucosidase extracellulaire. Celle-ci lui permet de s'approvisionner en mono et disaccharides ainsi qu'en pentoses.

❖ Besoins en source d'azote

Des études sur une vingtaine de souches d'*C. œni* montrent que, selon les souches, l'auxotrophie pour les acides aminés va de 5 à 13 acides aminés (Tableau I.2).

Il a été démontré que des composés peptidiques levuriens de 0,5 à 10 kDa peuvent stimuler la croissance d'*C. œni* et ont un effet remarquable par rapport à un milieu contenant uniquement des acides aminés libres. L'utilisation des fractions peptidiques de masse moléculaire supérieure à 10 kDa a un effet bien moindre (Remize et al., 2006). D'après Alexandre et al. (2008), sur un milieu contenant de l'azote peptidique, la consommation nette d'azote pendant la phase de croissance représente moins de 5 mg.L⁻¹ alors que sur un milieu sans peptide, une consommation de 50 à 60 mg.L⁻¹ selon les souches peut être insuffisante pour avoir une biomasse capable de réaliser la FML

Tableau I. 2. Comparaison des besoins en acides aminés de vingt souches d'*Æ. æni* (Alexandre et al., 2008)

	Garvie, 1967	Fourcassié et al., 1992	Remize et al., 2006
Acide glutamique	E	E	E
Arginine	E	E	N (2/5) ; E (3/5)
Isoleucine	E	E	N (2/5) ; E (3/5)
Tryptophane	N (2/9) ; E (7/9)	E	N (1/5) ; E (4/5)
méthionine	N (5/9) ; E (4/9)	E	E
Valine	E	N (3/6) ; E (3/6)	N (1/5) ; E (4/5)
Cystéine	E	I (2/6) ; E (4/6)	N (4/5) ; E (1/5)
Tyrosine	E	I (5/6) ; E (1/6)	E
Phénylalanine	N (2/9) ; E (7/9)	I (5/6) ; E (1/6)	E
Histidine	N (3/9) ; E (6/9)	I (5/6) ; E (1/6)	N (2/5) ; E (3/5)
sérine	I (2/9) ; N (5/9) ; E (2/9)		E
Lysine	I	I (2/6) ; N (3/6) ; E (1/6)	N (4/5) ; E (1/5)
Acide aspartique	I (6/9) ; N (3/9)	N	I (2/5) ; N (3/5) ; E (1/5)
Leucine	I (5/9) ; N (3/9) ; E (1/9)	N (3/6) ; E (3/6)	N (1/5) ; E (4/5)
Thréonine	I (7/9) ; N (1/9) ; E (1/9)	I	I (3/5) ; N (2/5) ; E (1/5)
Glycine	I (6/9) ; N (1/9) ; E (2/9)	I	I (3/5) ; N (2/5)
Proline	I	I	I (2/5) ; N (3/5)
alanine	I	I	I (4/5) ; N (1/5)

E : l'acide aminé est essentiel ; N : nécessaire ; I : indifférent. Le rapport entre parenthèse indique le nombre de souches par rapport à la totalité des souches testées. L'absence d'indication numérique signifie que toutes les souches de l'étude sont concernées.

Ĉ. œni, est généralement exigeante pour l'acide glutamique et le couple sérine/glycine. D'ailleurs un transport énergie-dépendant du glutamate a été démontré chez *Ĉ. œni* 8403 (Vasserot et *al.*, 2002). Cependant il a été noté que cette espèce, est la bactérie lactique comportant le moins de gènes de transporteurs d'acides aminés.

❖ Exigences en vitamines et en minéraux

Plusieurs vitamines sont essentielles pour la croissance des bactéries lactiques, en particulier le groupe B des hydrosolubles : l'acide pantothénique (B₅), la biotine (B₉), la thiamine (B₁), et la niacine (B₃) (Terrade et De Orduña, 2009 ; Lonvaud-Funel et *al.*, 2010). La pyridoxine (B₆) et la riboflavine (B₂) sont nécessaires pour une croissance optimale de certaines souches. L'acide folique (B₉) et la cobalamine (B₁₂) sont des cofacteurs de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, ils sont donc nécessaires si ces bases sont absentes dans le milieu. La vitamine B₅ a déjà été identifiée comme un facteur de croissance chez *Ĉ. œni*.

Certains éléments minéraux sont des cofacteurs d'enzymes ou associés à certains mécanismes de transport. Jusqu'à l'heure actuelle peu de données sont disponibles sur les besoins réels en ces éléments.

En conclusion, *Ĉ. œni* n'est pas très exigeante en matière de source de nutriments. Ceci lui permet de quand même se développer dans le vin malgré l'épuisement d'une partie des ressources du milieu lors de la fermentation alcoolique par les levures. Dans ce milieu elle réalisera un métabolisme complexe : voie hétéro-fermentaire d'assimilation des sucres, catabolisme des acides organiques, métabolisme des polysaccharides, des peptides et des protéines, production du pyruvate par de multiples voies. Cette complexité permet de produire de nombreux métabolites qui conféreront au vin ses caractéristiques aromatiques : esters, aldéhydes, alcools, cétones ...etc.

En outre, les travaux de biologie moléculaire (physiologie, génétique, biochimie...etc) effectuées pour récolter des informations sur *Ĉ. œni* sont importants et intéressants pour une bonne connaissance de cette espèce bactérienne et pour mieux définir ses conditions de croissance optimale. Néanmoins, les fonctionnalités de beaucoup de protéines et de peptides potentiellement exprimés par des gènes bien déterminés ne sont pas encore établies. Vu qu'*Ĉ. œni* présente des particularités par rapport aux autres bactéries lactiques et vu qu'elle est

l'agent principal de la FML du vin, la détermination des rôles de chaque gène exprimé est souhaitable. En particulier les mécanismes de résistance au stress restent mal connus.

2.2. Facteurs influençant la fermentation malo-lactique

Les conditions physico-chimiques stressantes du vin après la FA comme la concentration élevée en éthanol, la faible acidité (pH de 3 à 4), la présence d'anhydride sulfureux et le déficit en nutriments constituent un obstacle à la FML. Selon Ribéreau- Gayon et *al.* (1998), l'alcool est le premier facteur inhibiteur limitant la FML. Ensuite vient le degré de maturité du raisin, sous-entendu l'acidité du jus de raisin : plus la teneur en acide malique est élevée (maturité insuffisante) plus la FML est nécessaire mais difficile à obtenir. Alors que si l'acidité est faible (raisins très mûrs), la FML est plus facile à réaliser et son incidence gustative est moins grande. En revanche, dans ce dernier cas les risques d'une déviation bactérienne accidentelle sont accrus.

Actuellement des levains malo-lactiques sélectionnés sont utilisés pour supporter les conditions difficiles du vin. Néanmoins, ceci ne garantit pas toujours la FML et parfois des contaminations par des germes nocifs comme les bactéries acétiques et les levures du genre *Brettanomyces* peuvent se produire. En effet, quand la FML est désirée, les vins ne sont pas protégés à la fin de la FA par du SO₂ libre et donc un retard de la FML ou son échec favorise le développement de micro-organismes indésirables (Nehme, 2008).

En général, les principaux facteurs affectant la FML sont classés en 3 catégories comme le montre le tableau I.3.

Tableau I. 3. Facteurs influençant la croissance et la survie des bactéries (Nehme, 2008)

Conditions physicochimiques	<ul style="list-style-type: none">- pH,- Température,- Facteurs associés à la vinification (pratique de cave, sulfitage, macération, débourbage, élevage sur lies...etc).
Composition du vin	<ul style="list-style-type: none">- Ethanol,- Acides gras,- sucres et polyols,- Acides organiques,- Composés phénoliques,- Composés azotés,- Facteurs de croissance : vitamines et oligoéléments,- Gaz (O₂, CO₂),- Fongicides, pesticides.
Facteurs biologiques	<p>Interactions avec :</p> <ul style="list-style-type: none">- levures,- bactéries,- bactériophages.

2.2.1. Débourbage

Cette opération qui permet de clarifier le moût de raisin à l'avantage d'éliminer une grande partie des levures et des bactéries. Il est effectué avant la FA en vinification en blanc. Mais en parallèle les moûts très clarifiés sont appauvris en macromolécules. Selon Alexandre *et al.* (2008) plus la clarification est intense, plus la fermentation alcoolique est longue en relation très souvent avec des populations levuriennes plus faibles, alors qu'une meilleure fermentescibilité malo-lactique (flore indigène ou flore sélectionnéeensemencée) est observée dans ce cas. Ils en déduisent qu'il existe une relation entre les durées de la FA et de la FML. En outre, ces auteurs notent que les levures produisent une plus forte quantité de macromolécules au cours de la FA dans les moûts clarifiés que dans ceux pas ou peu clarifiés. Ceci est favorable pour la FML puisque les macromolécules extracellulaires produites par des levures stimulent davantage le développement d'*C. œni* que les macromolécules présentes dans les raisins (Guilloux-Benatier *et al.*, 1995). En effet, il a été observé que la phase de latence devient plus courte et la biomasse bactérienne finale est plus importante.

2.2.2. Macération pelliculaire

La macération pelliculaire est une technique utilisée en vinification en blanc et en rosé avec des raisins sains et surtout pour des années de bonne maturité. Elle consiste à favoriser la dissolution dans le moût des substances odorantes et/ou responsables de la couleur contenues dans la pellicule.

Indépendamment de l'aspect sensoriel, selon Alexandre et *al.* (2008), la macération favorise tant le déclenchement de la FML que son déroulement. La vitesse de la fermentation est d'autant plus grande que la macération est longue. Cette opération de macération se traduit par une augmentation de pH (précipitation de l'acide tartrique provenant de l'enrichissement par du potassium) et selon ces auteurs seule cette élévation du pH pourrait expliquer la meilleure fermentescibilité observée du vin macéré.

2.2.3. Élevage sur lies

Pendant cette phase il se produit l'autolyse de *S. cerevisiae* qui se déroule après la mort cellulaire et qui correspond à une auto dégradation de la cellule se traduisant par la libération dans le milieu extracellulaire de composés levuriens. Compte tenu des conditions du milieu, l'autolyse se déroule lentement. Les métabolites libérés ont des rôles multiples : facteurs de stabilisation tartrique et protéique, fixateurs d'arômes et probablement agent de flaveur (Alexandre et *al.*, 2008). Il a été aussi démontré que les acides aminés, les peptides et les macromolécules pariétales libérées au cours de l'autolyse ont un intérêt positif sur la croissance des bactéries lactiques (Guilloux-Benatier et Chassagne, 2003). En outre, vu qu'*L. acidophilus* possède les systèmes nécessaires pour cataboliser les composés de lyse de la levure (cf. paragraphe 2.1.2 de ce chapitre), et comme en plus cette bactérie a une préférence pour les composés levuriens par rapport à ceux du raisin, cette pratique favorise sa croissance.

Cependant, l'élevage sur lies peut avoir un effet stimulateur comme il peut avoir un effet inhibiteur sur la FML. Selon la souche de levure utilisée pour la FA, on n'obtient pas les mêmes effets (Patynowski et *al.*, 2002) car l'autolyse des levures peut enrichir le milieu en facteurs de croissance stimulant la FML mais aussi en composés toxiques inhibant la croissance, la nature de ces composés n'a pas été précisée par ces auteurs.

2.2.4. Potentiel d'hydrogène pH

Le pH du vin est un facteur déterminant pour la croissance des bactéries lactiques et pour la conduite de la FML. Il exerce une pression sélective en faveur des bactéries les plus résistantes au pH bas ou qui sont acidophiles comme *CE. œni*.

Selon Alexandre et *al.* (2008) la limite de pH est plus basse pour les souches d'*CE. œni* que pour les pédiocoques et les lactobacilles ; elle est de 2,9 à 3,0 pour *CE. œni* et de 3,4 à 3,5 pour les autres espèces. Ces pH limites dépendent fortement des autres constituants (éthanol et SO₂) ou des conditions de culture (température). Plus le pH sera élevé plus la diversité bactérienne sera grande et de ce fait les risques d'altération augmentent. Inversement, un milieu très acide ne permet la présence que des souches appartenant à l'espèce *CE. œni*.

En milieu de laboratoire, le pH optimum de croissance est de l'ordre de 4,8. Au dessous de cette valeur la croissance est d'autant plus faible que le pH est faible. Dans le vin, lorsque le pH est faible la phase de latence est prolongée et la croissance est ralentie, alors que si le pH est élevé, la phase de latence passe inaperçue (Nehme, 2008). Bien qu'un pH bas inhibe l'utilisation des sucres et la croissance d'*CE. œni*, la vitesse de dégradation de l'acide malique est plus élevée. Les levains produits à pH 3,5 dégradent plus rapidement l'acide malique que ceux produits à pH 5,5. Le pH influence l'activité spécifique de l'EML qui est optimale à pH compris entre 3 et 3,2 pour les souches *CE.œni* (Henick-Kling, 1990). Il a été reporté ailleurs que l'activité de cette enzyme est optimale à 5,75 (Lonvaud-Funel et *al.*, 2010). Il semble que dans ce dernier cas il s'agit du pH intracellulaire.

Lorsque on désire le départ de la FML, un pH excessivement bas peut être contrôlé en l'ajustant à l'aide du CaCO₃ sans enlever une quantité excessive d'acide tartrique (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1998).

Des tests chez la souche *CE. œni* ATCC BAA 1163 montrent qu'une biomasse maximale est obtenue à pH 4,5 et à pH 5,3 mais la vitesse de croissance à pH 4,5 est plus faible qu'à pH 5,3 (Alexandre et *al.*, 2008).

2.2.5. Température

Le développement des bactéries lactiques est possible dans une gamme de température allant de + 15 à + 45 °C ; elles sont mésophiles. La température optimale de croissance d'*CE. œni* est de 28 °C et est abaissée autour de 20 °C lorsque les bactéries sont placées dans des conditions

limitantes : pH bas ou présence d'éthanol (Alexandre, 2008). La température et l'éthanol agissent de façon synergique sur la limitation de la FML. La température optimale pour la FML en présence d'éthanol entre 10 et 14 % (v/v) est de l'ordre de 20 à 25 °C (Asmundson et Kelly, 1990). Cependant, pour une bonne réussite de la FML, Ribéreau-Gayon *et al.* (1998), recommande de la conduire à une température aussi basse que possible (18-20 °C par exemple) et ce pour limiter les risques de déviation, en particulier la production excessive d'acidité volatile par attaque de constituants autres que l'acide malique.

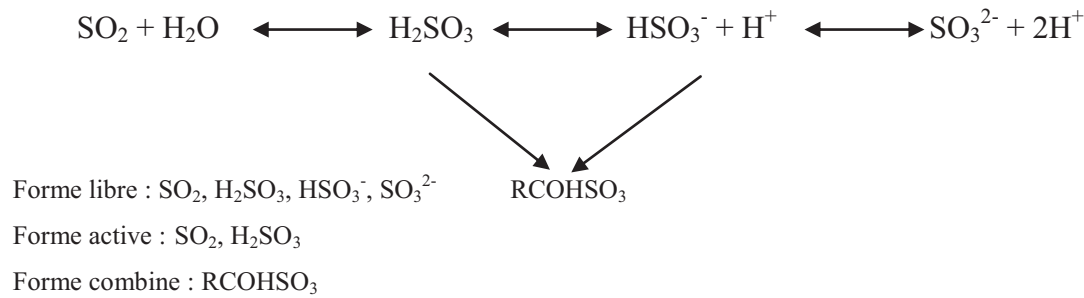
2.2.6. Anhydride sulfureux SO₂

Le processus de vinification implique des interactions du fait de la présence de différents micro-organismes : levures, champignons, bactéries lactiques et bactéries acétiques. S'il n'y a pas de contrôle des micro-organismes indésirables, l'altération microbienne du vin peut se produire à différentes étapes de son élaboration.

L'anhydride sulfureux (SO₂) est le produit chimique utilisé pour le contrôle des micro-organismes indésirables et pour lutter contre les phénomènes d'oxydations.

Les vendanges doivent être sulfitées à des doses comprises entre 30 et 100 mg.L⁻¹ de SO₂ (30 à 60 mg.L⁻¹ pour la vinification en rouge et 60 à 100 mg.L⁻¹ pour la vinification en blanc). Le non-sulfitage n'a pas de justification sérieuse même avec de la vendange très saine car elle n'est jamais exempte de micro-organismes et d'oxydases de raisin (Nehme, 2008). Néanmoins, les concentrations de SO₂ ne doivent pas être trop élevées, surtout lorsqu'on désire la FML pour ne pas inhiber la croissance des bactéries lactiques.

Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer l'effet du SO₂ sur les flores retrouvées dans les vins. Son action dépend fortement du pH. En effet, Alexandre *et al.* (2008) expliquent que le pH du vin influe directement sur la dissociation du dioxyde de soufre dans le milieu (figure 1.6). En effet, plus le vin sera acide plus la proportion de SO₂ sous forme libre sera importante (H₂SO₃ et SO₂). Ce composé diffuse dans la cellule bactérienne et se retrouve sous la forme HSO₃⁻ car le pH intracellulaire des bactéries est voisin de 6,5. La libération des protons H⁺ acidifie donc le cytoplasme et entraîne la mort cellulaire.



SO_2 total = forme libre + forme combinée

Figure I. 6. Différentes formes de l'anhydride sulfureux dans le vin

Malgré le mécanisme d'action explicité du SO_2 , il semblerait que les bactéries lactiques développent une certaine résistance vis-à-vis de celui-ci. Selon Alexandre et *al.* (2008), *C. œni* est capable de supporter une teneur de 30 mg.L^{-1} à un pH de 3,5 alors qu'elle meurt si la pré-culture est faite en milieu optimum. La croissance préalable en pH bas lui permettrait de maintenir un pH intracellulaire proche de 6 plus longtemps. En outre, le SO_2 avec l'éthanol favorise l'activité extra-peptidasique (cf. § 2.2.2 de ce chapitre).

Les souches commerciales *C. œni* EQ54 et VFO semblent capables de rompre la liaison du SO_2 combinée à l'acétaldéhyde et donc d'augmenter la forme de SO_2 ayant une action antimicrobienne (Osborne et *al.*, 2006). Parallèlement une augmentation en acétaldéhyde, qui est un composé volatil chimiquement très actif, se produit. En conclusion le complexe SO_2 -acétaldéhyde semble aussi avoir une action inhibitrice et peut retarder significativement le départ de la FML et même parfois conduire à son arrêt.

2.2.7. Éthanol

Évidemment, l'inhibition de la croissance d'*C. œni* par l'éthanol peut paraître surprenante puisque dans les vins la croissance des bactéries commence généralement à la fin de la fermentation alcoolique lorsque ils contiennent 10 à 12 % d'éthanol. En effet, il semble qu'au fur et à mesure que l'éthanol se produit dans le milieu, les souches qui demeurent résistantes aux conditions de stress s'y adaptent et donc supportent une certaine concentration en éthanol. C'est l'acclimatation naturelle des bactéries qui est d'ailleurs souvent utilisée pour la préparation des levains malolactiques. La tolérance à l'éthanol dépend des souches

bactériennes et des espèces. *Æ. œni* a en moyenne un seuil de tolérance de 13 à 14 % (v/v). King et Beelman (1986) constatent que l'éthanol, à de faibles concentrations (< 6 % v/v), stimule même la croissance des bactéries lactiques.

Les travaux de Manca de Nadra et *al.* (2005) ont démontré que chez *Æ. œni* X₂L isolée d'un vin Argentin, en présence d'éthanol et de SO₂ et uniquement d'une fraction de macromolécules azotées du vin rouge, des facteurs de croissance de cette souche (acides aminés essentiels comme asparagine, phénylalanine et histidine) ont été libérés à des concentrations élevées par rapport au cas sans éthanol et sans SO₂. Un effet synergique entre ses deux derniers a été obtenu. Ces conditions de stress, SO₂ et éthanol, semblent en effet être des stimulateurs de la production de l'enzyme extracellulaire qui dégrade les macromolécules peptidiques.

2.2.8. Acides gras

La pré-fermentation, pour certains vins, est caractérisée par une longue période de contact entre le jus et la peau des raisins après foulage de ceux-ci et avant leur pressurage. Cette étape permet un enrichissement du milieu en acides gras à longues chaînes (C₁₆ et C_{18:3}). L'influence des acides gras de C₁₀ à C_{18:3}, sous leurs formes estérifiées et non estérifiées, sur *Saccharomyces cerevisiae* et sur la croissance d'*Æ. œni* et l'activité malo-lactique a été étudiée (Guilloux-Benatier et *al.*, 1998). Un effet positif a été observé sur *S. cerevisiae* et particulièrement sur sa viabilité. En revanche, les formes estérifiées de C₁₀ et C₁₂ semblaient être toxiques pour *Æ. œni*. Cependant, une meilleure croissance de celle-ci dans les milieux pré-fermentés est probablement due aux concentrations élevées en macromolécules levuriennes, concentrations faibles en acides gras, plus particulièrement les C₁₀ et C₁₂ et la faible inhibition de l'activité malo-lactique par les acides gras C₁₀ à C_{18:3}.

2.2.9. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont parmi les principaux constituants qui confèrent au vin ses qualités sensorielles : goût, couleur, amertume et astringence. Ces composés proviennent de la pellicule des raisins, des pépins, de la rafle et du bois pendant l'élevage du vin. Ils sont classés en deux groupes (Macheix et *al.*, 1990) :

- 1- les non-flavonoïdes qui comprennent les acides phénoliques, les aldéhydes et les alcools. La plupart des composés de ce groupe présentent une structure simple et possèdent un ou plusieurs groupes hydroxyle et méthoxyle directement liés au noyau benzène.
- 2- les flavonoïdes qui comprennent les anthocyanes, les flavonols et les flavanols et qui possèdent l'anneau C₆-C₃-C₆ dans leur structure.

Les tanins sont définis comme étant des polymères de flavanols présentant une structure complexe capable de réaliser des interactions stables avec les protéines et d'autres polymères des plantes comme les polysaccharides. Selon leur unité structurale de base, les tanins sont divisés en :

- Tanins catéchiques ou condensés : polymères de catéchines et épicatechines (flavanols). Ce sont les tanins du raisin et sont aussi appelés pro-cyanidines.
- tanins hydrolysables avec l'acide gallique, l'acide ellagique (acides phénoliques) ou ses dérivés comme monomère. Ce sont les tanins provenant du bois.

Certains composés phénoliques peuvent inhiber les bactéries lactiques, d'autres peuvent les stimuler. Reguant *et al.* (2000) et Alberto *et al.* (2001) ont montré que la catéchine stimule la croissance et la FML d'*Æ. œni* et de *Lactobacillus hilgardii*. Au contraire, Vivas *et al.* (2000) ont montré que les pro-cyanidines (polymères de catéchine et d'épicatechine) affectent négativement la viabilité d'*Æ. œni*. Certains acides phénoliques affectent négativement la croissance et la viabilité des bactéries lactiques (Campos *et al.*, 2003).

Figueiredo *et al.* (2007) ont testé différents aldéhydes phénoliques (les cinnamaldéhydes : coniferaldéhyde et sinapaldéhyde et les benzaldéhydes : vaniline, syringaldéhyde, p-hydroxybenzaldéhyde ; 3,4-dihydroxybenzaldéhyde et 3,4,5-trihydroxybenzaldéhyde) et ont trouvé que la plupart avait un effet inhibiteur. Les cinnamaldéhydes, en particulier les sinapaldéhydes étaient les plus inhibiteurs de la croissance bactérienne.

Les acides hydroxycinnamiques libres semblent affecter négativement la croissance de *Lb. Plantarum* et quelques autres espèces de *Lactobacillus*. Il semble que l'acide férulique ait plus d'effet que l'acide p-coumarique (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008). En revanche, les esters de ces acides, comme l'acide non-phénolique et l'acide quinnique, n'affectent pas la croissance de *Lb. Plantarum* (Salih *et al.*, 2000). En outre, il a été constaté que, dans des conditions synthétiques de laboratoire, l'effet de ces composés dépend de leurs concentrations ; les bactéries peuvent tolérer et métaboliser des concentrations entre 100 et 250 mg.L⁻¹, ce qui

peut probablement expliquer l'effet bénéfique de ces composés sur la croissance. En revanche, des concentrations supérieures à 500 mg.L⁻¹ produisent un effet toxique (Stead, 1993). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas clair. Garcia-Ruiz et *al.* (2007) proposent que ces composés phénoliques affectent les protéines de la membrane cellulaire de la bactérie, ce qui perturbe l'organisation des échanges intra et extracellulaires (sorties des composés de la cellule, comme K⁺, acide glutamique, ARN intracellulaire...etc). L'altération de la composition des acides gras a aussi été suggérée (Rozès et Perez, 1998). Pour expliquer ce mécanisme d'inhibition, Campos et *al.* (2003) suggèrent que les composés phénoliques s'adsorbent aux parois des cellules et les altèrent.

En conclusion, les composés phénoliques présentent des effets à la fois positifs et négatifs sur la croissance des bactéries lactiques et donc sur la FML. Cet effet dépend, d'une part, de la structure et de la dose du composé en question et d'autre part, de l'espèce bactérienne ainsi que des conditions du milieu.

2.2.10. Pesticides

L'utilisation des pesticides juste avant la période de la récolte du raisin est proscrite car il y a des risques de les retrouver dans les vins. Bordons et *al.* (1998) ont montré que pour certains pesticides (Cu²⁺, dichlorofluanide) les concentrations souvent retrouvées dans les vins sont de l'ordre des quantités minimales nécessaires pour l'inhibition d'*C. œni*. Un mg.L⁻¹ de Cu²⁺ n'affecte pas le FML mais 5 mg.L⁻¹ la retardent de 12 jours ! L'inhibition par le cuivre peut être due à sa compétition avec le Mg²⁺, cofacteur important de l'activité enzymatique de l'ATPase membranaire, ce qui va entraîner une inhibition de l'activité enzymatique de cette dernière (Carreté et *al.*, 2002). Ces derniers montrent que 20 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ réduisent l'activité spécifique de l'ATPase de 23,5 %. Le dichlorofluanide à 2 mg.L⁻¹ peut avoir un effet significatif. La sensibilité varie avec la souche et certains *Lactobacillus* semblent être plus résistants.

2.2.11. Oxygène O₂

La croissance des bactéries lactiques se fait soit dans des conditions d'anaérobiose soit de microaérophilie. Elles ne respirent pas et sont donc de métabolisme fermentaire. On distingue (Nehme, 2008) :

- les aérotolérantes : ce sont celles qui tolèrent l'oxygène mais qui sont incapables de l'utiliser.
- les anaérobies facultatifs : elles se développent mieux en absence d'oxygène mais l'oxygène n'est pas toxique.
- les microaérophiles : elles ont une meilleure croissance en présence de faibles quantités d'O₂.

En conditions de laboratoire, Nehme (2008) a évalué et comparé les cinétiques de croissance d'une souche *Æ. œni* sous trois conditions : air, CO₂ et azote. La biomasse maximale obtenue sous air a été respectivement 2,73 et 2,43 plus faible que celle obtenue sous azote et sous CO₂. La vitesse spécifique maximale de croissance a été également plus élevée dans le cas du CO₂. Les vitesses globales de consommation d'acide malique sous azote et sous CO₂ ont été proches mais supérieures à celle sous air. Selon cet auteur, le CO₂ et l'azote semblent donc plus favorables pour la FML, avec une légère priorité pour le CO₂. *Æ. œni* est donc le plus souvent une bactérie anaérobie facultative, elle se développe mieux sous azote et sous CO₂ qui assurent les meilleures conditions. Ces conditions se rapprochent des conditions naturelles retrouvées en vinification puisque le milieu devient rapidement saturé en CO₂ au cours de la FA.

Tataridis (2001) a aussi comparé les cinétiques et les rendements de croissance d'*Æ. œni*, souche 17A3 cultivée sous air et sous CO₂. Sous CO₂, un gain de temps important a été observé (102 h contre 125 h sous air) et la biomasse maximale obtenue a été presque doublée. Lemaresquier (1987) avait aussi constaté que le CO₂ a une influence positive sur la croissance de certaines bactéries lactiques.

En revanche, dans la pratique, Peynaud (1981) note que le remontage à l'air, en vinification en rouge, est toujours positif pour le déclenchement de la FML. Alexandre et al. (2008) expliquent ceci en suggérant que l'effet n'est pas directement lié à l'apport de l'oxygène, mais pourrait résulter d'une perte de SO₂ engendrée par le remontage à l'air.

L'effet de l'O₂ dans ce cas reste à élucider. Dans tous les cas un excès en O₂ peut favoriser le développement indésirable des bactéries acétiques qui sont aérobies.

2.2.12. Antimicrobiens

D'autres alternatives existent pour substituer ou coupler avec un autre traitement le SO₂ utilisé en vinification comme antimicrobien qui présente certains inconvénients : 1) les fortes concentrations de SO₂ peuvent entraîner l'altération organoleptique du produit fini ; 2) les risques sanitaires probables du SO₂ ; 3) les pressions par la législation sur les doses limites utilisés de SO₂. Il y a donc une forte tendance à la recherche d'autres antimicrobiens.

Une alternative propose l'utilisation de bactériocine pour lutter contre la flore indésirable dans les vins. La nisine est une bactériocine commerciale utilisée pour la conservation des aliments. La possibilité de contrôler la croissance bactérienne pendant la vinification par la combinaison du SO₂ et de la nisine a été étudiée par Rojo-Bezares et *al.* (2007) dans l'objectif de diminuer les concentrations de SO₂ utilisées en vinification. Il a été conclu que l'utilisation appropriée des combinaisons de concentrations de nisine et du méta bisulfite peut contrôler la croissance des flores d'altération. Chung et Hancock (2000) ont trouvé qu'il y a une synergie d'inhibition entre la nisine combinée avec le lysozyme pour un test effectué sur *Lactobacillus curvatos*. Des tests ont été aussi effectués sur quatre autres souches de *Lactobacillus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Brochothrix thermosphacta*. Le mélange de la nisine et du lysozyme améliore dans chaque cas les concentrations minimales inhibitrices.

Nel et *al.* (2002) ont testé l'effet du Pediocine PD-1, de la plantacirine 423 et de la Nisine sur les biofilms d'*Æ. œni* formés à la surface d'acier inoxydable dans des moût modifiés de Chardonnay. Toutes les cellules, viables et non viables, ont été éliminées après une heure de traitement par du Pediocin PD-1. Dans les mêmes conditions expérimentales, le traitement avec du plantacirine 423 et de la Nisine révèle l'absence de cellules viables. Pour la Pediocine PD-1, après 5 heures de traitement, il en résulte l'absence de cellules viables, pour une population initiale d'*Æ. œni* de $1,3 \times 10^{10}$ CFU.ml⁻¹. En outre, Bauer et *al.* (2005) ont observé que le peptide antimicrobien Pediocine PD-1, synthétisé par *Pediococcus damnosus* NCFB 1832, a une forte activité contre les cellules d'*Æ. œni*, au pH du milieu 5,0 et à 25 °C. D'après eux, cette activité anti-*Æ. œni* semble due à la formation des pores au niveau des membranes cellulaires et ils suggèrent aussi que c'est peut être dû à l'inhibition de la biosynthèse au niveau de la paroi cellulaire ce qui entraîne la mort cellulaire.

Dans le cadre des interactions de type amensalisme (§ 3.1.2), la protéine (5,9 kDa) produite par *S. cerevisiae* possède une activité antimicrobienne contre *CE. œni* (Obsorne et Edwards, 2007). Nehme (2008) ont démontré que les souches de *S. cerevisiae* C et D, produisent un peptide de poids moléculaire de 5 à 10 kDa qui est capable de réduire la vitesse de consommation d'acide malique de 25 %. Et il a été constaté que ce peptide agit de façon complémentaire avec l'éthanol, et sa présence semblait être essentielle pour inhiber fortement la FML.

Des molécules de nature peptidique et de poids moléculaire inférieur à 1000 Da produites par une souche de *L. plantarum* et une souche de *P. pentosaceus*, ont aussi été mises en évidence, comme ralentissant la vitesse de croissance d'*CE. œni* et diminuant la biomasse formée (Lonvaud et al., 2010).

En ce qui concerne *CE. œni* elle même, les études de Tataridis (2001) étaient les premières à s'intéresser aux interactions entre les souches de cette espèce. En effet, des inhibitions ont été observées entre des couples de cette bactérie (DSMM7008 et 17A3, EQ54 et 21A3, 19A3 et EQ77, 17A3 et 21A3), éventuellement par production de métabolites extracellulaires. Plus récemment, Knol et al. (2008) ont mis en évidence la présence d'une activité antimicrobienne chez 8 souches d'*CE. œni* (R1098, R1101, R1105, R1106, R1108, R1118, R1123, R1124) testées, en milieu solide, contre : une souche *CE. œni* 48, six souches d'espèces différent des lactobacillus, trois souches d'espèces différent des Pseudomonas, une souche de *Listeria monocetogenes* et une souche de *Enterococcus faecilis*. Ceci laisse supposer que ces souches d'*CE. œni* produisent des bactériocines contre ces dernières espèces. Quatre gènes putatifs, du génome d'*CE. œni*, codants des bactériocines ont été identifiés et séquencés par les mêmes auteurs.

En définitive des molécules antimicrobiennes (bactériocines par exemple) peuvent inhiber la croissance des bactéries lactiques et la FML et d'autres peuvent les stimuler.

Il semble que le mode d'action d'un des facteurs influant la croissance d'*CE. œni* (température, éthanol, O₂, pH, SO₂, acides gras... etc) se situera au niveau de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique qui sont en contact direct avec l'environnement et ce tant pour l'inhibition que pour la stimulation. En revanche, stimuler ou inhiber un micro-organisme peut aussi s'effectuer, respectivement, par apport de substrat essentiel ou par une déficience en nutriment ; et dans ce cas c'est tout le système cellulaire qui serait mis en cause..

Cependant, d'autres phénomènes existent, à savoir l'action sur les protéines intracellulaires. Dans le cas de stress, ces protéines seraient affectées, ce qui entraîne leurs agrégations, qui

peut par la suite entraîner la mort cellulaire. En effet, les protéines chaperonnes sont des composés qui permettent le bon repliement et le maintien de formes tridimensionnelles des protéines (structurelles et/ou fonctionnelles), que se soit au niveau cytoplasmique, membranaire ou au niveau extracellulaire. Sugimoto et *al.* (2008) ont présentés 14 protéines chaperonnes identifiés chez *Æ. ãni* (facteur de croissance, sHsps, Hsp10, Hsp60, Hsp70, Hsp40, Hsp33, GrpE, ClpC, ClpE, ClpL, ClpP, ClpX et Lon), ce qui pourrait expliquer sa résistance aux conditions de stress. Il faut savoir qu'il a été constaté que *Æ. ãni*, en particulier PSU-1 et BAA-1163, présentent des mutations de gènes considérables par rapport à d'autres bactéries lactiques des vin *Pediococcus pentosaceus* et *Leuconostoc mesenteroides* (Marcobal et *al.*, 2008). Ces auteurs expliquent ce phénomène par le fait que ces souches d'*Æ. ãni* manquent ou perdent les genes *musT* et *musL* codant deux enzymes clés qui interviennent dans la réparation des modifications spontanées au niveau du génome. L'hypermutabilité observée peut probablement contribuer à l'adaptation unique du genre *Oenococcus* dans le milieu vin acide et alcoolique. Cette hypermutabilité pourrait être contraignante pour l'étude et l'identification des agents d'interactions entre ces bactéries mais elles pourraient être minimales pour des tests dans des milieux modèles similaires.

Cette bactérie forme généralement des chaînettes, ce qui réduit la surface de contact de sa population avec son milieu stressant. De plus, le fait qu'elle soit en chaînette peut laisser supposer qu'il y a des phénomènes de symbiose entre elles et/ou de communication par le « quorum sensing », celui-ci pouvant nécessiter un contact direct entre les bactéries (cf. § 3.1.3).

En conclusion, la bibliographie sur les facteurs qui influencent la FML nous informe que ces facteurs sont multiples à agir sur la croissance d'*Æ. ãni* et sur le déclenchement de la FML ainsi que sur son déroulement. Il existe en outre des synergies d'inhibitions et des synergies de stimulation entre des combinaisons des différents facteurs.

De façon générale, *Æ. ãni* a la capacité de s'adapter à son écosystème complexe et très stressant puisque c'est la seule à résister dans les vins. Si le vinificateur peut contrôler la température, le SO₂ et dans une moindre mesure le pH, il reste difficile de tout maîtriser pour le bon déroulement de la FML. La sélection des levains malo-lactiques les plus résistants, avec des performances œnologiques optimales, permet d'améliorer cette situation. Cependant, la présence inévitable d'autres micro-organismes dans le milieu donne lieu à des phénomènes d'interaction entre les populations. C'est pourquoi de nombreuses recherches se focalisent actuellement sur la maîtrise des facteurs biologiques :

- 1) traitement des flores d'altérations (cf. § 2.2.12 de ce chapitre) ;
- 2) étude et compréhension des interactions entre bactéries lactiques du vin et autres micro-organismes présents : levures, bactéries indigènes.

3. Interactions entre micro-organismes

Dans de nombreux procédés fermentaires, les fermentations se déroulent dans des milieux naturels (jus de raisin, lait...etc.). Ces milieux sont généralement non stériles et comportent une flore indigène constituée d'un mélange de populations microbiennes. Pour une meilleure maîtrise du procédé de transformation, le milieu naturel est souventensemencé par une souche sélectionnée dans le but qu'elle devienne l'agent microbien majoritaire. Des interactions entre micro-organismes peuvent alors avoir lieu.

Dans ce paragraphe, les différents types d'interactions entre micro-organismes seront d'abord présentés avant d'exposer les stratégies existantes pour l'étude des interactions entre les micro-organismes.

3.1. Différents types d'interactions entre micro-organismes

Il existe deux types d'interactions entre micro-organismes : directe et indirecte. Comme leur nom l'indique les interactions directes impliquent un contact physique entre deux populations. Il s'agit des interactions de prédation, parasitisme et inhibition par contact direct entre micro-organismes (cell-cell contact mechanism). Les interactions indirectes sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme et la compétition.

Dans ce paragraphe, les différents types d'interactions sont d'abord présentés. Ensuite nous exposons ce qui est le phénomène du « quorum sensing » chez les micro-organismes.

3.1.1. Interactions directes

❖ Prédation et parasitisme

Pour ces deux types d'interactions, une des espèces vit aux dépens de l'autre. Dans le cas de la prédation, la proie devient un substrat totalement digéré par le prédateur. Alors que dans le cas du parasitisme, seule une partie des tissus de la victime est consommée. Ainsi les bactéries peuvent être parasitées par des virus comme le bactériophage P58 chez *Æ. æni* (Arendt et al. 1991).

❖ Inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism »

Dans ce type d'interaction, une population microbienne est inhibée par une autre, ceci par un contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni de la limitation en nutriment ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée en cellules viables (Nehmé, 2008). Nissen et al. (2003) ont démontré l'existence de ce type d'inhibition par contact direct chez la souche *Kluyveromyces thermotolerans* et chez la souche *Torulaspora delbrueckii* en culture mixte avec *S. cerevisiae*. Néanmoins, les mécanismes de cette inhibition restent inconnus.

3.1.2. Interactions indirectes

❖ Mutualisme

Le mutualisme est classé en deux types : mutualisme (symbiose) et synergisme (proto-coopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le cas de la symbiose la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre, alors que dans le cas de la proto-coopération l'absence d'un des micro-organismes n'est pas fatale pour l'autre, mais leur présence ensemble stimule et améliore leur développement. D'ailleurs, il a été observé récemment que la croissance des pro-biotiques lactiques du lait (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* et

Bifidobacterium animalis) avec *Streptococcus thermophilus* est meilleure en co-culture (avec contact direct) qu'en culture pure de chacune des bactéries. Ceci prouve la présence d'une synergie entre le métabolisme de *S. thermophilus* et le métabolisme des autres bactéries lactiques (De Souza Oliveira et al., 2009). L'évaluation des interactions a été principalement basée sur la comparaison des paramètres cinétiques suivants : 1) le temps de génération ; 2) la vitesse maximale d'acidification V_{max} ; 3) le temps d'atteinte de V_{max} : t_{max} ; 4) le temps d'atteinte du pH 5,0 : $t_{pH5,0}$; et 5) le temps de fermentation qui est défini comme le temps d'atteinte du pH 4,5 : $t_{pH4,5}$.

❖ Neutralisme

La présence d'une population n'affecte pas l'autre. Aucun changement dans la croissance des populations n'est observé dans le cas du neutralisme. Ce type d'interaction n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels totalement différents.

❖ Commensalisme

Une des populations profite de la présence de l'autre. Cela peut avoir lieu si une des populations produit une substance nécessaire pour la croissance de l'autre ou si une des populations consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre.

❖ Compétition

Les populations se développent sur le même substrat et consomment toutes un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance. L'exemple de la compétition entre les levures et les bactéries lactiques est souvent cité. En effet, au début de la FA au niveau de laquelle la croissance des bactéries lactiques s'arrête rapidement aux profits du développement des levures. Cet arrêt de croissance est considéré comme un avantage, lorsque l'espèce défavorisée reste viable dans l'attente de nouvelles conditions favorables après la mort de son concurrent. Les bactéries lactiques, principalement *C. œni*, se développent après la FA, lorsque *S. cerevisiae* entre en phase de croissance stationnaire et relargue des facteurs de croissance (King et Beelman, 1986 ; Lonvaud-Funel et al., 1988). Le cas de la compétition pour l'azote a été remarqué entre

S. cerevisiae et *Torulaspota delbrueckii*, cette interaction a été traduite par la diminution des *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008). Chez les mêmes espèces la compétition a été également constatée pour l'oxygène mais dans ce cas elle avait aboutit à la réduction de *T delbrueckii* (Holm et al., 2001)

❖ Amensalisme

Une des populations produit une substance ayant un effet négatif sur la croissance de l'autre. Cette situation est semblable à la compétition exceptée que dans le cas de l'amensalisme une des populations n'est pas affectée par l'interaction.

Le cas typique d'amensalisme chez les levures est la toxine killer produite par certaines souches de *S. cerevisiae* et qui entraîne la mort des souches sensibles (Carrau et al., 1993, Ramon-Portugal et al., 1994). Une autre relation d'amensalisme entre levures a été observée entre *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Taillandier et al., 1995). Cette dernière semble capable d'inhiber la croissance de *S. cerevisiae* et d'augmenter sa mortalité. Par rapport à certaines souches d'*C. œni*, un autre cas d'amensalisme a été mentionné chez *S. cerevisiae* par production d'éthanol lors de la fermentation (Tataridis, 2001). Osborne et Edwards (2007) ont observé qu'il n'existe pas une corrélation claire entre la production de SO₂ et l'inhibition bactérienne durant la FA du vin. Ils ont donc montré que, chez la souche *S. cerevisiae* RUBY.ferm, il y a un autre mécanisme d'inhibition d'*C. œni* qui est la production d'une protéine de 5,9 kDa. La capacité d'inhibition de celle-ci semble être dépendante de la présence de SO₂. Nehme (2008) a démontré que 2 souches (D et C) de *S. cerevisiae* produisent chacune un peptide de 5 à 10 KDa, qui semblent inhiber la souche X d'*C. œni* testée et réduire sa vitesse de consommation d'acide malique. D'après les travaux de Lai (2010), une interaction de type amensalisme a été montrée entre une souche de *S. cerevisiae* et une souche de *Torulaspota delbrueckii*. En culture mixte, la souche de *S. cerevisiae* se développait normalement, comme en culture pure, alors que la souche de *T. delbrueckii* présentait une chute importante de sa viabilité.

3.1.3. Phénomène du 'Quorum Sensing'

Le « quorum sensing (QS)» est un mécanisme de communication cellulaire par lequel une population microbienne 'estime' sa densité cellulaire par production et détection de

l'accumulation d'une molécule signal libérée dans son environnement (Bassler et Losick, 2006). Le principe est qu'au fur et à mesure que le nombre de cellules d'une population bactérienne augmente, la concentration en molécule signal libérée dans le milieu augmente proportionnellement. Lorsque la concentration correspondant à un seuil est atteint, le groupe détecte la molécule signal et y répond par inhibition de la croissance ou lyse de bactéries par exemple.

Le QS a plusieurs rôles de régulation chez les micro-organismes : il régule la bioluminescence (*Vibrio*), l'aptitude au développement et à la sporulation, la synthèse d'antibiotiques, les facteurs d'induction de la virulence chez les plantes et les animaux, l'infection des hôtes, la production de bactériocine, la différenciation cellulaire et le flux de nutriments avec d'autres événements physiologiques dans la bactérie (Gobbetti et al., 2007). D'autres exemples expliquant ces phénomènes de contrôle par le QS ont été démontrés, nous citons :

- la fratricide : cannibalisme chez *Bacillus subtilis* en produisant des toxines au cours du processus de sporulation (Gonzalez-Pastor et al., 2003 ; Ellermeier et al., 2006) et le phénomène d'autolyse chez *Streptococcus pneumoniae* (Guiral et al., 2005; Håvarstein et al., 2006) ;
- Aoki et al. (2005) ont démontré l'inhibition de certaines souches d'*Escherichia coli* de laboratoire (*E. coli* K12) par contact direct avec certaines des souches sauvages de cette bactérie *E. coli*. L'inhibition est faite par une paire de protéines nommées CdiA et CdiB qui ressemblent à des protéines de sécrétion des 2 partenaires.

Il semble donc que le phénomène du QS est toujours présent pour ordonner au mieux la vie d'un micro-organisme vis-à-vis de son écosystème.

Les bactéries utilisent le QS pour communiquer entre elles ou entre des espèces différentes en utilisant des molécules signal différentes : principalement les lactones acyl-homosérines (AHL) chez les bactéries Gram négative, et les peptides auto-inducteurs (AIP) aussi appelés peptides phéromones chez les bactéries Gram positives.

La majorité des bactéries Gram positive sécrète des petits peptides antimicrobiens (AMP_s) qui sont régulés par le QS (Klaenhammer, 1993). La classe des AMP_s I est thermostable Ce sont des peptides qui subissent des modifications après la traduction. Alors que la classe II est thermostable et ne subit pas de modification des acides aminés. Chez les bactéries lactiques, pour cette 2^{ème} classe, sa régulation par le QS ne suit pas le modèle de régulation par la

densité cellulaire et la production d'AMP_s. Il dépend des conditions environnementales (Gobetti et *al.*, 2007).

3.2. Stratégies d'étude des interactions entre micro-organismes

Il existe différentes méthodes d'étude des interactions directes et des interactions indirectes. Dans ce paragraphe, nous présentons tout d'abord les cultures en milieux solides, ensuite les cultures en milieu liquide, comprenant différents types de tests d'interactions entre micro-organismes du vin ; à savoir culture mixte, co-culture et culture séquentielle. Enfin, les différentes techniques d'identification des interactions indirectes entre micro-organismes seront présentées.

3.2.1. Cultures en milieu solide

Cette première méthodologie d'étude des interactions entre micro-organismes a été inspirée de la technique des antibiogrammes (Lemaesquier, 1987) et développée pour l'étude des interactions levures/bactéries. Le principe est le même sauf que l'antibiotique a été remplacé par un autre micro-organisme. Il consiste à épandre une couche uniforme de bactérie dans la masse de la gélose d'une boîte de Pétri puis d'ensemencer la levure en anneaux à la surface. L'apparition de halos clairs autour des spots levuriens signifie qu'il y a inhibition de la croissance de la bactérie par celle-ci (Figure I.7). La quantification du pourcentage d'inhibition se fait par mesure du diamètre des halos autour des dépôts de levure. Pratiquement, cette mesure de diamètre semble être difficile à réaliser avec une précision acceptable.

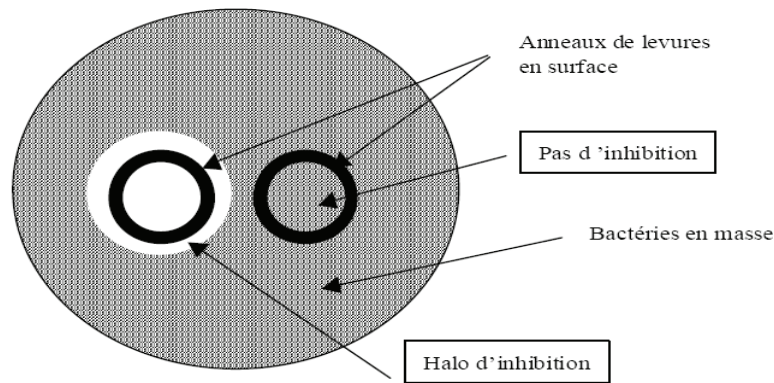


Figure I. 7. Exemple du test d'interaction levures/bactéries en milieu gélosé sur boîtes de Pétri (Taillandier et al., 2002)

Lemaresquier (1987) a testé 58 souches de *Saccharomyces cerevisiae* sur *L. aenos*. Quatre types d'interactions ont été mis en évidence :

- absence d'interaction : présence d'un trouble homogène sur toute la surface de la boîte.
- Inhibition stricte des bactéries par les levures ; dans ce cas il n'y a pas de formation de colonies bactériennes dans la partie centrale des anneaux et dans l'espace situé entre les 2 anneaux.
- Stimulation plus inhibition des bactéries ; pour ce cas de figure, on observe en plus de l'inhibition au centre et entre les deux anneaux, une prolifération des colonies bactériennes au dessus et en dessous de l'espace situé entre les deux anneaux de levure ainsi que sur leur porteur. L'observation à la loupe binoculaire révèle qu'à cet endroit la densité des colonies est beaucoup plus grande. Il été conclu qu'une autre substance ou catégorie de substance qui stimule la croissance est diffusée par les levures.
- Stimulation stricte des bactéries par les levures ; dans ce cas la levure peut relarguer dans le milieu des substances utiles à la bactérie et peut ainsi activer sa croissance.

Il a été aussi constaté qu'une même souche de bactérie peut présenter les quatre types de comportement en fonction de la souche levurienne testée.

A part l'aspect qualitatif, l'étude des interactions en milieux solides reste très limitée. Entre autres, elles ne permettent pas de :

- Standardiser et fixer la composition du milieu gélosé et la durée d'incubation ;

- homogénéiser le milieu. Les métabolites extracellulaires, selon leur poids moléculaires, diffusent différemment dans le milieu gélosé ;
- réaliser des échantillons ;
- suivre d'autres activités que la croissance comme la consommation de l'acide malique dans le cas de la FML;
- effectuer le suivi des paramètres cinétiques ;
- caractériser le métabolite inhibiteur ou stimulateur ;
- quantifier le taux d'interaction.

D'autres auteurs ont essayé d'améliorer les cultures en milieux gélosés. Arnink et *al.* (2005) ont aussi utilisé la méthode sur boîte de Pétri inspirée des antibiogrammes. Ces auteurs se sont basés sur la susceptibilité des bactéries vis-à-vis d'une substance donnée. En effet, des disques de papier-filtre sont imprégnés par les milieux pré-fermentés par les levures *S. cerevisiae* et déposés sur des géloses contenant les bactéries lactiques *Æ. œni*. Les molécules imprégnées dans le disque diffusent de façon radiale dans l'agar. Dans le cas d'inhibition une zone claire va se former autour du disque. Dans le cas contraire, de stimulation, une zone dense se formera.

Les méthodes sur gélose sont difficiles à standardiser et surtout à extrapoler aux conditions œnologiques. Elles ne permettent d'évaluer que la croissance mais pas l'activité malo-lactique. Pour ces raisons l'adoption des cultures en milieux liquides a été envisagée.

3.2.2. Cultures en milieux liquides

➤ Cultures séquentielles

Ces cultures simulent les fermentations naturelles dans le procédé de vinification. Il s'agit en effet de réaliser les deux fermentations (FA et FML) de manière consécutive ; la FML démarre quand la FA est achevée. Dans l'objectif d'évaluer l'effet des levures sur la croissance de la bactérie et sur l'activité malo-lactique, le milieu pré-fermenté par la levure sera ultérieurement inoculé par une souche d'*Æ. œni*. Notons qu'en fin de FA, le milieu présente plusieurs contraintes (concentration d'éthanol élevée, SO₂, manque de nutriments, acides gras, protéines...etc) qui peuvent être évaluées à l'aide de différents tests et dosages.

➤ Cultures mixtes ou co-cultures

Contrairement aux cultures séquentielles dans lesquelles l'ensemencement des 2 micro-organismes à étudier se fait consécutivement pour les cultures mixtes, l'ensemencement des deux micro-organismes se réalise en même temps ou avec un très petit décalage et donc les deux se développent et interagissent simultanément.

Des études ont été réalisées en milieux liquides (King et Beelman, 1986 ; Caridi et Corte, 1997). Elles sont plus fastidieuses, surtout dans le cas de cultures mixtes lorsque les 2 populations ont des niveaux très différents (levures/bactéries) ou appartiennent à la même espèce (bactéries/bactéries). Il est alors très difficile de les suivre séparément. L'analyse des cultures mixtes en milieu liquide impose la numération différentielle de chacune des cellules de la co-culture (co-culture d'espèces d'un même genre ou de souches d'une même espèce). Dans la plupart des cas, cette numération passe par l'isolement de colonies et l'identification de ces colonies. Cependant, l'estimation par numération de colonies n'est pas toujours fiable car une même colonie peut se développer à partir de plusieurs cellules ou comme pour les bactéries *E. coli* se mettre naturellement en chaînettes. De plus, la distinction entre les colonies des souches appartenant à la même espèce n'est pas évidente. Le recours aux méthodes de biologie moléculaire telle que la q-PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) est possible mais coûteuse dans le cas de suivis cinétiques réguliers. Cette technique n'est pas encore faisable pour le suivi des souches, appartenant à une même espèce, en culture mixte.

Le tableau I.4 résume les avantages et les inconvénients de différentes méthodologies d'évaluation des interactions entre micro-organismes. Les méthodes de cultures en milieu gélosé et en milieu liquide (avec contact direct) seront alors choisies en fonction des objectifs des études conduites. En effet, dans le but de faciliter et de rendre possible l'étude des interactions indirectes entre des micro-organismes, des techniques utilisant les principes de la séparation membranaire ont été développées : des tubes de dialyse, des supports perméables ou des bioréacteurs à membranes.

Tableau I. 4. Comparaison des méthodes d'étude des interactions microbiennes dans le cas de la FML en œnologie (Taillandier et al., 2002)

Méthode	Avantages	Inconvénients
Milieu gélosé en boîtes de Pétri	- Rapide - Assez simple	- Évaluation de la croissance et pas de la FML - Conditions très différentes de la réalité
Milieu liquide de laboratoire	- Reproductibilité - Témoin possible	- Conditions assez différentes des conditions réelles
Conditions œnologiques	- Extrapolation plus facile à priori - Estimation plus juste de la FML	Conditions variables d'un vin à l'autre - Pas de témoin possible => comparaison des couples

3.2.3. Techniques d'identification des interactions indirectes

Ces techniques se basent principalement sur l'utilisation d'une membrane filtrante, qui permet la séparation de 2 populations microbiennes dans 2 compartiments, tout en assurant le passage de molécules chimiques et l'homogénéité du milieu de part et d'autre de la membrane.

3.2.3.1. Tubes de dialyses et supports perméables

Les tubes de dialyse et les supports perméables fonctionnent sur la perméabilité naturelle de la membrane qui sépare deux micro-organismes dans deux tubes (tubes dialyses) ou deux compartiments (supports perméables Transwell® de Corning, Etats-Unis), en laissant passer seulement les composés du milieu fermentaire.

Les tubes de dialyse se composent d'un tube de dialyse à l'intérieur d'un autre tube.

L'insert de Transwell® possède une membrane de polycarbonate d'une porosité de de 0,4 à 1 µm. Cette membrane permet de séparer les micro-organismes dans 2 compartiments différents. Après l'inoculation de chaque compartiment à l'aide d'une suspension cellulaire,

l'incubation s'effectue sans agitation pour éviter les risques de contamination d'un compartiment à l'autre (Zott, 2008). Le système est donc considéré comme passif. L'avantage de cet outil réside dans sa simplicité d'utilisation. Cependant, il est dépendant de la perméabilité membranaire qui est souvent atténuée quand la biomasse est élevée ou quand des métabolites sont produits en grandes quantités. De plus des phénomènes de limitation de la vitesse de transfert des métabolites à travers la membrane peuvent subvenir du fait du manque d'agitation.

3.2.3.2. Bio-Réacteur à Membrane

Le Bio-Réacteur à Membrane (BRM) est l'outil le plus développé pour l'étude des interactions indirectes entre micro-organismes. Malgré la simplicité que présentent les tubes de dialyse et les supports perméables par rapport au BRM, les conditions de culture dans le BRM sont mieux contrôlées : 1) il a l'avantage de pouvoir agiter le milieu pour assurer le meilleur mélange du milieu de culture, 2) il évite le problème d'atténuation de la perméabilité membranaire grâce au basculement du milieu d'un compartiment à l'autre au cours de la culture ce qui permet d'assurer le décolmatage de la membrane au fur et à mesure, 3) la maîtrise des vitesses de mélange.

L'homogénéité du milieu est assurée de manière à ce que les micro-organismes qui se trouvent dans chacun des compartiments soient soumis au même environnement. En effet, les écarts de concentrations des différents solutés entre les deux compartiments influencent la dynamique de la réaction et par conséquent l'évaluation quantitative des interactions.

La description du principe de fonctionnement du BRM est détaillée dans le chapitre matériels et méthodes (Chapitre II). Ce BRM a été validé et utilisé au LGC pour plusieurs études qualitatives et quantitatives des interactions entre différents micro-organismes (Salgado et *al.*, 1999 ; Albasi et *al.*, 2001 ; Tataridis, 2001 ; Taillandier et *al.*, 2002 ; Pommier, 2003 ; Nehme, 2008 ; Lai, 2010).

4. Modélisation de la croissance microbienne

4.1. Croissance microbienne en culture discontinue

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en taille ou en nombre des micro-organismes. Pour provoquer une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et des conditions environnementales favorables. Le schéma de la croissance d'une population microbienne en culture discontinue, établi par Buchanan (1918) se décompose alors traditionnellement en sept phases distinctes (Figure I.8):

1) *La phase de latence*

Elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à proprement parler. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement. Cette phase dépend soit de l'âge de l'inoculum, soit d'une adaptation enzymatique. Par ailleurs, dans certaines conditions, la concentration initiale en cellules est si faible qu'il est difficile de quantifier l'augmentation du nombre d'individus. Ce phénomène est considéré comme une *pseudo-latence*. La phase de latence peut être limitée en utilisant comme inoculum une pré-culture prélevée en phase exponentielle.

2) *La phase d'accélération*

Elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette période, la valeur du taux spécifique de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{\max}).

3) *La phase de croissance maximale ou exponentielle*

Lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps, la pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance, μ_{\max} (h^{-1}):

$$\mu_{\max} = \frac{Y_2 - Y_1}{t_3 - t_2}$$

Dans cette phase le taux de mortalité est nul, l'activité métabolique est maximale et le taux de croissance est constant.

4) *La phase de décélération ou phase de freinage*

Elle intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent. La population continue à croître mais le temps de génération augmente.

5) *La phase stationnaire maximale*

Au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus ($\mu=0$) donc la population demeure stationnaire. Il y a un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules et le nombre de cellules qui meurent. Cette phase peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.

6) *La phase de début de décroissance*

Cette phase correspond à un début de disparition des cellules.

7) *La phase de décroissance exponentielle de la population*

La décroissance de la population apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraîne leur mort rapide.

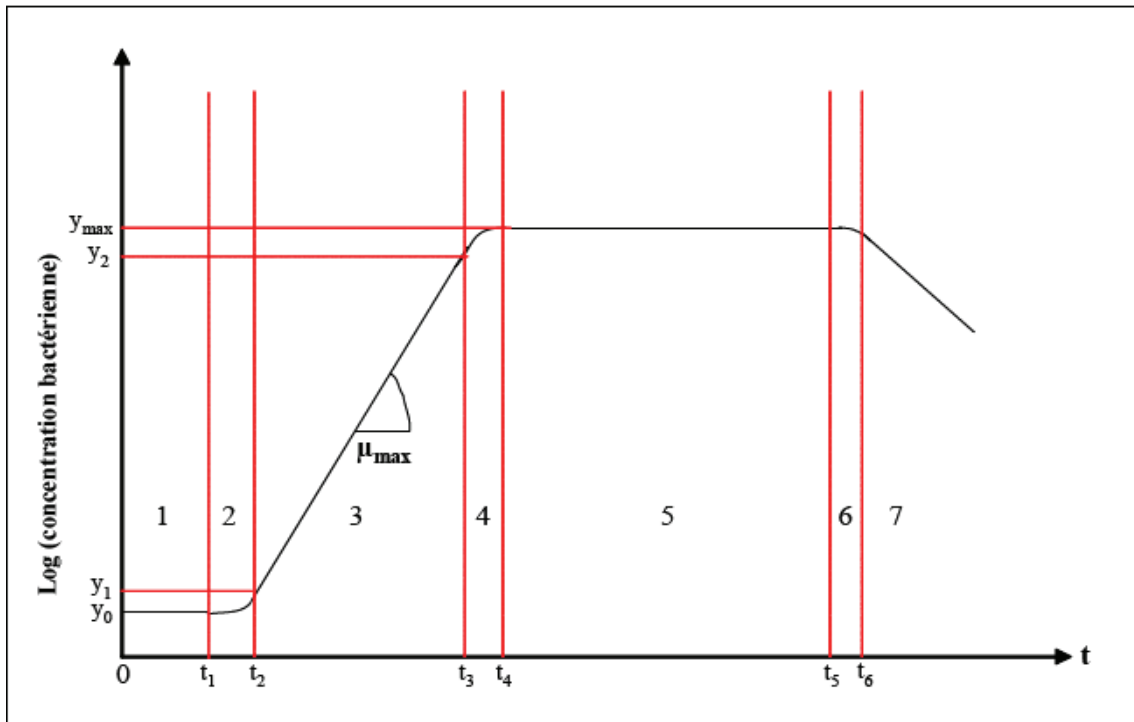


Figure I. 8. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (en discontinu) décrites par Buchanan (1918).

4.2. Modélisation

4.2.1. Généralités (Meyer, 2004)

La modélisation consiste à créer une représentation simplifiée d'un problème : le modèle. C'est une alternative à une stratégie de type essais-erreurs ; elle est appliquée dans différents domaines scientifiques : médecine, nucléaire, aéronautique, météorologie... et elle est également apparue dans d'autres disciplines, comme : économie, finance, sciences humaines...etc. Le modèle constitue une représentation possible du système pour un point de vue donné. En médecine par exemple, les modèles utilisés pour représenter l'Homme sont souvent le singe et la souris. Alors que pour d'autres phénomènes : physique, chimique... le modèle est représenté par des équations mathématiques.

La modélisation d'un phénomène, se fait toujours par rapport à un objectif. Suivant cet objectif, plusieurs modèles sont possibles pour décrire une même réalité. C'est pourquoi il est important de définir le cadre et le niveau de modélisation souhaité dès le début d'un projet.

Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à un ou plusieurs des trois besoins principaux : la compréhension de(s) phénomène(s), le contrôle et l'optimisation (**Pommier, 2003**).

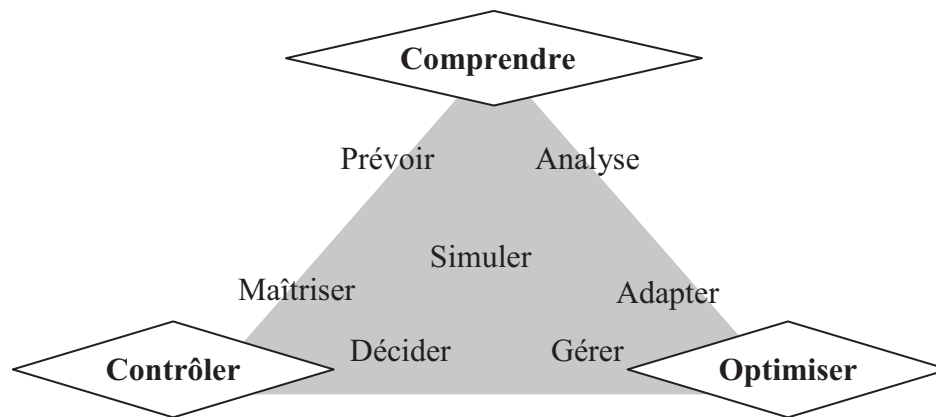


Figure I. 9. Schéma simplifié des objectifs de la modélisation (Pommier, 2003)

Le recours à la modélisation d'un phénomène requiert des connaissances mécanistiques et des données expérimentales. Selon le degré de connaissances acquises et des données expérimentales disponibles, différents types de modèles peuvent être adoptés, on distingue :

- ✓ Modèles de connaissance pure (mécanistes ou structurés) lorsqu'on dispose de suffisamment de connaissance avec de faibles données expérimentales. Ils ne sont généralement pas envisageables.
- ✓ Modèles phénoménologiques (non structurés), pour ce type de modèles on dispose de plus de connaissances que d'expériences.
- ✓ Modèles hybrides ; on dispose de plus d'expériences que de connaissances.
- ✓ Modèles empiriques ; comme son nom l'indique ces modèles sont essentiellement basés sur des données expérimentales avec de faibles connaissances du phénomène à représenter.

4.2.2. Modélisation des cinétiques de la croissance microbienne

La croissance microbienne est un phénomène globalement très complexe de par le nombre et la variété des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis à vis des conditions extérieures. Les modèles biologiques modernes cherchent à identifier, au-delà des corrélations, les liens de causalité susceptibles d'exister entre des phénomènes en apparence disjoints. Traditionnellement, on distingue deux grands groupes de modèles dans le domaine du génie microbiologique : les modèles non-structurés (ou phénoménologiques) et les modèles structurés.

Les modèles non-structurés s'appuient sur une vision globale de la cellule, sans détailler sa structure. Ainsi, la composition cellulaire est alors considérée comme constante et la notion de biomasse totale prime. Dans ce type de modèle, la variation de biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires distinctes (concentration en substrats, en produits du métabolisme et présence d'inhibiteurs de la croissance), ainsi que de certaines variables environnementales (pH, température, force ionique, etc...).

Les modèles structurés sont des expressions mathématiques qui prennent en compte la structure et la composition du micro-organisme (C, N, O). Ces types de modèles sont généralement complexes et requièrent une connaissance précise du fonctionnement des différentes structures de la cellule. Ils entraînent de plus une multiplication des paramètres du modèle ce qui pose souvent des problèmes d'identification quand des données expérimentales de composés intracellulaires ne sont pas disponibles.

Pour notre étude, nous nous intéresserons uniquement aux modèles non structurés. La première étape de la modélisation du métabolisme microbien consiste à décrire l'évolution de la population microbienne en fonction du temps dans des conditions environnementales particulières. Dans les modèles non structurés qui considèrent la biomasse dans son ensemble, sans distinguer les différents états physiologiques des cellules, la croissance est caractérisée par des paramètres tels que le temps de latence, le taux de croissance et le temps de génération. Les modèles non-structurés les plus répandus sont le modèle logistique et le modèle de Monod.

➤ **Le modèle Logistique (Verhulst, 1838)**

En 1838 Verhulst propose une équation différentielle afin de modéliser la croissance d'une population animale se stabilisant au cours du temps. Cette équation est connue sous le nom de loi Logistique. Elle repose sur l'hypothèse que l'accroissement relatif de la variable « y » modélisée décroît de façon linéaire avec elle.

$$\frac{dy}{dt} = a \times y \times \left(1 - \frac{y}{k}\right)$$

A ce jour, les applications de cette loi sont généralisées et couvrent à la fois les descriptions de croissance de cellules, d'organes ou d'organismes. En particulier, dans le cas de la description d'une cinétique de croissance de micro-organismes, elle prend la forme suivante, pour laquelle X représente la population microbienne et μ la vitesse spécifique de croissance :

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \times \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$$

Le paramètre μ_{\max} est la vitesse spécifique de croissance maximale supposée atteinte dès le début de la culture. X_{\max} est appelé capacité limite du milieu. Cette capacité limite correspond à la population maximale qui est obtenue en fin de croissance, début de la phase stationnaire. Ce modèle simule la vitesse de croissance par des équations qui font intervenir uniquement le temps et la concentration en biomasse. Le modèle Logistique a été largement utilisé pour modéliser la croissance de micro-organismes.

➤ **Le modèle de Monod**

Le modèle de Monod représente la base en matière de modélisation de la croissance microbienne (Strub, 2008). Il donne une relation entre la vitesse spécifique de croissance d'un micro-organisme, μ , et la concentration en substrat limitant, S.

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \times \frac{S}{S + K_s}$$

Cette équation dépend de deux paramètres :

- la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max})
- K_s , définie comme l'affinité que le micro-organisme a pour le substrat limitant. Sa valeur numérique correspond à la concentration en substrat nécessaire pour obtenir la moitié de μ_{\max} .

Ces deux modèles représentent donc uniquement les étapes de croissance d'une population. Cette famille de modèle contient des modèles basés sur l'observation des cinétiques macroscopiques au sein d'un bioréacteur. La composition cellulaire est considérée comme constante. D'un point de vue pratique, la population microbienne est généralement traitée comme une « boîte noire ». Dans beaucoup de cas, cette simplification est raisonnable parce qu'il est impossible de connaître la composition hétérogène de la biomasse et l'état des systèmes intracellulaire. En sciences du vivant, les modèles phénoménologiques permettent plus une description macroscopique qu'une compréhension microscopique des phénomènes biologiques.

Dans la majorité des modèles de ce type, la variation de la biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires (concentrations en substrats, produits et présence d'inhibiteur de la croissance), ainsi que de variables environnementales comme le pH ou la température. Messens *et al.* (2003) ont développé un modèle capable de prédire l'influence de la température (20 - 38 °C) et du pH (4,8 - 7) sur le comportement de *Lactobacillus curvatus* LTH1174, micro-organisme producteur de bactériocine. La croissance microbienne et la production de curvacin A sont affectées par les variations de la température. En revanche, elles supportent une large gamme de pH.

4.2.3. Modélisation des interactions microbiennes

La modélisation des interactions entre des micro-organismes se limite à l'étude d'une interaction entre 2 micro-organismes. Ces dernières années les recherches s'intéressent au développement de modèles mathématiques tenant compte de la diversité des micro-organismes et de leurs interactions, en particulier pour les cultures mixtes. Par rapport aux

cultures pures, les avancées des cultures mixtes sont faibles. Ceci est dû d'une part, aux difficultés rencontrées pour la quantification du vecteur de l'interaction (métabolites) qui empêche la mesure de ses vitesses de sa production et de sa dégradation ; d'autre part, le suivi de la biomasse de chaque souche dans une culture mixte est très difficile à mettre en œuvre avec précision. Ceci explique la rareté des modèles de croissance en culture mixtes.

Pourtant il existe un grand intérêt pour l'étude des interactions, essentiellement la compétition et l'amensalisme, qui sont importants dans le cadre des contaminations et des implantations forcées d'une souche dans un environnement donné, particulièrement en vinification et en production de produits laitiers fermentés.

➤ **Compétition pure**

La compétition est pure entre 2 souches de bactéries lorsque la teneur en substrat dans la culture atteint des valeurs suffisamment faibles pour réduire la vitesse de croissance d'au moins une des populations. En général, la vitesse de croissance des micro-organismes est sensiblement modifiée par le substrat uniquement à des concentrations très faibles ou très élevées. Par exemple, si la vitesse de croissance obéit à l'équation de Monod cette limite est de l'ordre de la constante K_S .

Dans une culture discontinue, la teneur en substrat est faible uniquement en fin de fermentation et pendant une période de temps très brève. Ainsi, dans une culture mixte discontinue les souches n'entrent en compétition qu'en fin de culture, quand les populations ont déjà une taille très proche de leur taille finale. Cependant, dans le cas où les vitesses spécifiques maximales (μ_{max}) sont différentes entre les deux souches, pour celle qui a la plus faible μ_{max} , le niveau de population atteint lors de la culture mixte sera plus faible que celui de la culture pure, La vitesse de croissance n'est pas affectée mais la quantité de substrat consommé est affectée. Pour cette raison le seul effet visible de la compétition est une réduction dans la taille finale des deux populations, par rapport à celle atteinte en culture pure sous des conditions identiques (**Salgado, 1999**). En réalité, tant que les teneurs en substrats ne limitent pas la vitesse de croissance, il n'y a pas de vraie compétition et la culture se trouve dans un état transitoire de neutralisme.

➤ **Amensalisme**

Comme nous l'avons déjà cité, le développement des modèles pour l'étude des interactions type amensalisme sont rares. Ce paragraphe présente quelques exemples :

Kim et al. (1987) ont développé un modèle tenant compte de l'activité de certaines enzymes pour représenter la croissance en culture mixte discontinue de *Klebsiella oxytoca* (X_1) et *Pseudomonas aeruginosa* (X_2) sur des milieux contenant du glucose (S_A) et du citrate (S_B). Ces 2 micro-organismes sont capables de se développer sur les deux substrats mais leurs préférences sont opposées : *K. oxytoca* préfère le glucose par rapport au citrate tandis que *P. aeruginosa* c'est l'inverse.

Le substrat non préféré de chaque souche est limité par le niveau d'expression d'une enzyme clé : E_1 pour la consommation de S_B et E_2 pour la consommation de S_A .

La production d'un inhibiteur I de *P. aeruginosa* par *K. oxytoca* a été supposée associée à la croissance de *K. oxytoca* sur glucose et sa dégradation a été considérée proportionnelle à la biomasse de *K. oxytoca*. Le modèle est représenté par les équations différentielles suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = (\mu_{1A} + \mu_{1B}) \times X_1 \\ \frac{dX_2}{dt} = (\mu_{2A} + \mu_{2B}) \times X_2 \\ \frac{dE_1}{dt} = k_1 \times \left(\frac{S_B}{K_{E1} + S_B} \frac{K_{R1}}{K_{R1} + S_A} - E_1 \right) \\ \frac{dE_2}{dt} = k_2 \times \left(\frac{S_A}{K_{E2} + S_A} \frac{K_{R2}}{K_{R2} + S_B} - E_2 \right) \\ \frac{dS_A}{dt} = -\mu_{1A} \times X_1 \times \left(\frac{1}{Y_{S_{A1}}} + \frac{\alpha}{Y_1} \right) - \frac{\mu_{2A}}{Y_{S_{2A}}} \times X_2 \\ \frac{dS_B}{dt} = -\frac{\mu_{2A}}{Y_{S_{2B}}} \times X_2 - \frac{\mu_{1B}}{Y_{S_{1B}}} \times X_1 \\ \frac{dI}{dt} = \alpha \times \mu_{1A} \times X_1 - \beta \times X_1 \end{array} \right. \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} \mu_{1A} = \mu_{\max} \times \frac{S_A}{K_{S_{1A}} + S_A} \\ \mu_{1B} = \mu_{\max,1B} \times \frac{S_B}{K_{S_{1A}} + S_B} \times E_1 \\ \mu_{2A} = \mu_{\max,2A} \times \frac{S_A}{K_{S_{2B}} + S_A} \times E_2 \\ \mu_{2B} = \mu_{\max,2B} \times \frac{S_B}{K_{S_{2B}} + S_B} \times \frac{K_1}{K_1 + I} \end{array}$$

Ramon-Portugal *et al.* (1997) ont proposé un modèle mathématique dans l'étude de l'interaction type amensalisme appelé phénomène «killer» entre 2 souches de levure. Ce modèle est inspiré de la loi logistique. En effet, une levure killer produit une protéine qui est capable de tuer des levures sensibles. L'hypothèse fondamentale que Ramon-Portugal a posé, qui est la base du développement du modèle est que le même métabolite, I , ralentit et arrête la croissance des deux souches de *S. cerevisiae* utilisées, K1 et 522 D. Le composé inhibiteur n'est pas identifié mais la variable I englobe les différents facteurs inhibiteurs (éthanol, acides gras,...). L'interaction killer fait intervenir la concentration en toxine dans le milieu de culture.

Le modèle est basé sur des bilans établis pour 6 différents variables : population killer viable ($X_{v,k}$) ; population killer morte ($X_{d,k}$) ; population sensible viable ($X_{v,s}$) ; population sensible morte ($X_{d,s}$) ; concentration en toxine dans le milieu (T), avec P_T sa production et C_T sa consommation ; et enfin concentration en inhibiteur de croissance (I). La dynamique d'évolution de chacun de ces variables est donnée par le système d'équations suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_{v,k}}{dt} = r_{v,k} - r_{d,k} \\ \frac{dX_{v,s}}{dt} = r_{v,s} - r_{d,s} \\ \frac{dX_{d,k}}{dt} = r_{d,k} \\ \frac{dX_{d,s}}{dt} = r_{d,s} \\ \frac{dT}{dt} = r_{P_T} - r_{C_T} \\ \frac{dI}{dt} = r_I \end{array} \right.$$

Ce modèle s'est révélé adapté pour reproduire les résultats observés en culture discontinue exceptée dans les premières heures de la fermentation, dans lesquels l'activité killer n'est pas suffisamment importante.

Néanmoins, Pommier (2003) a confronté ce modèle, proposé par Ramon-Portugal, à ses données expérimentales. Le modèle s'est révélé mal adapté pour décrire les cinétiques de

croissance obtenues. Et ce bien que le modèle soit basé sur des résultats cinétiques issus des fermentations mixtes dans des conditions proches des siennes : même souche killer, même milieu de culture. Seule la souche sensible est différente ; il s'agit dans les deux cas de *S. cerevisiae* ayant des performances cinétiques voisines, mais dont la sensibilité au facteur killer est différente.

Pommier a donc tenté d'apporter des modifications à ce modèle :

i) l'introduction du temps de latence dans le modèle, n'a apporté aucune amélioration significative dans l'adéquation aux données expérimentales ;

ii) une formulation de la loi logistique, pour laquelle le comportement de chacune des souches est dépendant à la fois de son propre développement et du développement de la souche qui cohabite, a été proposée et été intégrée dans le modèle initial ; son intégration a conduit à des résultats satisfaisants ;

iii) la prise en compte du pH sur la toxicité effective de la protéine killer sécrétée. Cette modification a permis une meilleure représentation de la fin des cultures pour lesquelles l'interaction létale disparaît ;

iv) cette dernière modification est basée sur l'idée qu'il faut qu'un nombre minimal de sites récepteurs sur les cellules sensibles soient occupés par la toxine avant que l'effet létal de celle-ci se manifeste. Le modèle proposé permet la prise en compte ou non d'une fixation partielle de la toxine sur les cellules killer. Ce modèle permet aussi d'obtenir des résultats satisfaisants.

En ce qui concerne la mise en équation des co-cultures entre des souches d'*Æ. ani*, une seule étude a abordé la modélisation de ce type de cultures entre différentes souches de cette espèce (DSMM7008 et 17A3, EQ54 et 21A3, 19A3 et EQ77, 17A3 et 21A3) en BRM (Tataridis, 2001). Tataridis a quantifié l'effet des interactions sur la croissance par le calcul des caractéristiques cinétiques à l'aide des équations de la loi logistique. L'évaluation de l'effet des interactions sur la consommation d'acide malique a été tentée en tenant compte de l'influence de l'inhibition sur la croissance. La quantification de l'effet de l'interaction sur la consommation d'acide malique s'avère difficile à réaliser.

Finalement, cette étude bibliographique montre qu'il existe peu d'études sur la modélisation des interactions entre des couples de micro-organismes et ce pour plusieurs raisons :

- 1) l'introduction de l'agent biologique dans les systèmes d'équations est difficile en raison de l'évolution des caractéristiques physiologiques qui dépend des facteurs environnementaux.
- 2) la difficulté expérimentale pour identifier et pour quantifier l'agent d'interaction (métabolites inhibiteurs ou stimulateurs)
- 3) la difficulté expérimentale pour réaliser des suivis de biomasse en cultures mixtes.
- 4) la difficulté à distinguer compétition d'amensalisme

4.3. Conclusion

La vinification est le bioprocédé qui permet de produire les différents types de vins : vins blanc, rouge, rosé...etc. Dans l'objectif de satisfaire les attentes du consommateur en terme de qualités organoleptique et sanitaire du vin, la compréhension, le contrôle et la maîtrise de chacune des étapes de ce procédé sont indispensables.

Dans le cas, des vins rouges et de certains vins blancs, la première fermentation (FA) effectuée par les levures est suivie par la fermentation malo-lactique (FML). Cette dernière a différents impacts (diminution de l'acidité, stabilité microbiologique, formation de certaines molécules aromatiques). La FML est donc l'une des étapes critiques pour la réussite de la qualité organoleptique du produit attendu.

La bactérie lactique *CE. œni*, principalement responsable de la FML n'est pas trop exigeante en matière de nutriments et elle a un métabolisme complexe qui lui permet de survivre dans le milieu vin pré-fermenté par les levures (pauvre en nutriments). Néanmoins, ce milieu est très contraignant pour *CE. œni*. Différents facteurs peuvent affecter sa croissance et affecter son activité malo-lactique : éthanol, pH, température, acides gras...etc. En outre, les levures de la FA et les bactéries lactiques indigènes peuvent libérer dans le milieu des métabolites antimicrobiens. Celles-ci sont à l'origine de différents types d'interactions qui peuvent exister entre ces micro-organismes : stimulation, inhibition ou neutralité par exemples.

En ce qui concerne les interactions entre *Enococcus*, l'inhibition d'une souche d'intérêt par une souche inhibitrice indigène affecte négativement la qualité du vin et son rendement économique. Dans ce contexte, différentes études ont été menées pour évaluer la production

de molécules inhibitrices par des souches de levures et de bactéries en vue de sélectionner des couples levure-bactérie et/ou bactérie-bactéries les mieux adaptés pour la production du vin.

Les cultures mixtes ou co-cultures dans lesquelles les 2 souches sont mélangées ne permettent pas de distinguer les interactions indirectes des interactions directes. Notre travail a comme objectif l'étude des interactions indirectes entre différentes souches d'*Æ. œni*. Le BRM est un outil qui devrait permettre d'identifier l'existence de telles interactions par production de métabolite(s) extracellulaire(s) et de quantifier l'impact de la présence d'une souche sur l'autre.

Le recours à la modélisation devrait nous permettre de compléter cette approche en formalisant par des relations mathématiques les différences entre cultures pures et cultures mixtes et donc l'effet de l'interaction.

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Souches de bactéries et conditions de conservation

Cinq souches de bactéries *CE. œni* nommées dans ce mémoire A, B, C, D et E ont été utilisées. Ces souches proviennent de la collection des partenaires de l'ANR DIVOENI (n°ANR-07 BDIV 011-01). La souche A est la souche de référence de la collection nommée ATCC BAA 1163 dans la littérature ; B et C sont des souches indigènes respectivement isolées de champagne et de cidre de Normandie ; D et E sont des souches œnologiques commerciales isolées du vin.

Les bactéries sont conservées au congélateur à -20°C dans du bouillon MRS additionné de 20% de glycérol.

1.2. Milieux de cultures

Milieu de réactivation des bactéries (pré-levain)

Il s'agit de bouillon MRS (Biokar diagnostic, Beauvais, France) additionné de 4 g.L⁻¹ d'acide L-malique. Le pH du milieu est alors de 5,2.

Milieu pour l'inoculum (le levain)

Il s'agit de bouillon MRS additionné de 4 g.L⁻¹ d'acide L-malique, 2 g.L⁻¹ de D-fructose et 5% d'éthanol. Le pH est ajusté à **4,8** avec du H₃PO₄ à 85 %.

Milieu pour la fermentation malo-lactique (FML)

Il s'agit de bouillon MRS additionné de 4 g.L⁻¹ d'acide L-malique, 2 g.L⁻¹ de D-fructose et **10** % d'éthanol. Le pH est ajusté à **3,5** avec du H₃PO₄ à 85%.

Milieu de dénombrement bactérien

On utilise du MRS agar additionné de 4 g.L⁻¹d'acide L-malique et 5 g.L⁻¹d'agar. Le pH est ajusté à 5,7 à l'aide de NaOH à 10 M.

Ces milieux de cultures sont autoclavés avant l'ajout de l'éthanol. Les barèmes d'autoclavage sont :

- pour le milieu de réactivation, le milieu d'inoculum et le milieu de dénombrement : 20 minutes à 121 °C.
- pour le milieu de fermentation : 20 minutes à 110 °C.

Composition théorique du milieu MRS bouillon

Polypeptone	10 g.L ⁻¹
Extrait de viande	10 g.L ⁻¹
Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
Glucose	20 g.L ⁻¹
Tween 80	1,08 g.L ⁻¹
Dipotassium phosphate	2 g.L ⁻¹
Acétate de sodium	5 g.L ⁻¹
Citrate d'ammonium	2 g.L ⁻¹
Sulfate de magnésium	0,2 g.L ⁻¹
Sulfate de manganèse	0,05 g.L ⁻¹

La composition du milieu MRS agar est identique à celle du MRS bouillon avec en plus 15 g.L⁻¹ d'agar.

2. Méthodes

2.1. Procédure pour les cultures

Un volume de 100 µl de la suspension bactérienne conservée à -20°C est d'abord dégelé et transféré dans 10 ml de milieu de réactivation puis est incubé pendant 65 h à 28°C sans agitation. Cette culture sert de pré-levain pour inoculer le milieu inoculum à 1 % (v/v). Celui-

ci est incubé à 28°C sans agitation pendant 50 à 80 h selon les souches (cf. § 1.1.1 du chapitre III). Le milieu de fermentation est alors inoculé à 2×10^6 UFC.mL⁻¹ et est incubé à 20°C. Les corrélations $\text{UFC} = f(\text{DO})$ sont présentées en annexe. Les suivis cinétiques de biomasse et de consommation d'acide L-malique sont effectués en faisant quotidiennement des prélèvements aseptiques, jusqu'à l'arrêt de la fermentation malo-lactique c'est-à-dire lorsque l'acide malique est épuisé.

2.1.1. Cultures en condition de micro-aérobie

Des cultures de fermentation de chacune des souches ont été réalisées sous atmosphère d'air, dans 250 mL du milieu de FML en fioles d'Erlenmeyer de 500 mL, sans agitation, excepté aux moments des prises d'échantillons. Le volume d'inoculation à raison de 2×10^6 UFC.mL⁻¹ est de l'ordre de 1 à 5,5 mL environ selon les souches.

2.1.2. Cultures e conditions d'anaérobiose

2.1.2.1. Cultures en fioles d'Erlenmeyer

Pour l'étude de l'influence de l'acide malique sur la croissance, des FML ont été aussi suivies en fioles d'Erlenmeyer sous atmosphère d'azote et sous agitation à 100 rpm. Pour chaque souche, 1 à partir du même inoculum, deux fermentations ont été réalisées : une contenant 4 g.L⁻¹ et une sans acide L-malique.

2.1.2.2. Cultures en Bio-Réacteur à Membrane

Le Bio-Réacteur à Membrane (BRM) est utilisé pour étudier les cultures mixtes de couples de micro-organismes (cf. § 3.2.3.2 en chapitre I).

➤ Principe du BRM

Il s'agit de confiner deux micro-organismes différents dans deux compartiments séparés par une membrane à fibres creuses, tout en assurant l'homogénéité du milieu de culture grâce à une circulation alternative d'une partie de ce milieu entre les compartiments. De cette

manière, les souches se développent isolées l'une de l'autre, mais les interactions indirectes liées aux métabolites extracellulaires peuvent se produire comme si les souches étaient dans un même réacteur. Par contre, l'étude des interactions directes est impossible avec cet outil. L'avantage de ce bioréacteur est donc de pouvoir suivre les populations distinctement par prélèvements dans chacun des compartiments tout en étudiant le comportement de celles-ci en culture mixte.

➤ Description du BRM

Ce bioréacteur schématisé en figure II.1 est constitué de deux réservoirs dont l'un renferme une membrane de filtration à fibres creuses. La circulation du milieu au travers de cette membrane est assurée par une surpression (0,4 à 0,7 bar) et contrôlée par des sondes à niveau. Un gaz comprimé est introduit alternativement dans l'espace de tête d'un réservoir alors que le deuxième reste ouvert à l'atmosphère. Il en résulte une différence de pression transmembranaire qui induit un déplacement du milieu d'un compartiment vers l'autre.

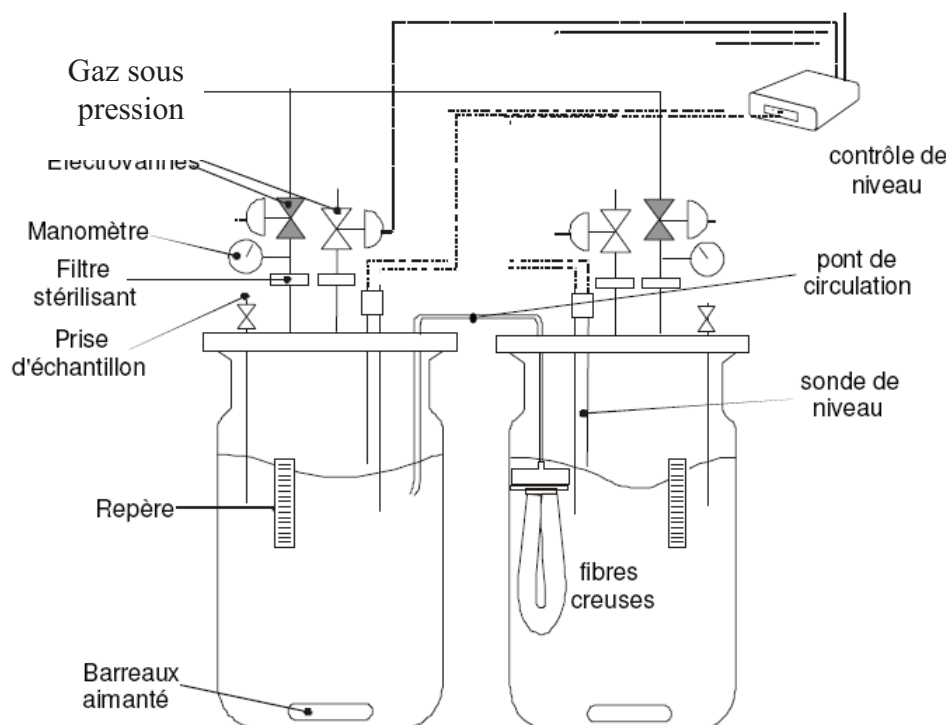


Figure II. 1. Bioréacteur à membranes pour l'étude de cultures mixtes de micro-organismes.

L'entrée et la sortie du gaz dans chaque compartiment sont contrôlées par un couple d'électrovannes : l'une contrôlant l'entrée et qui est normalement fermée, et l'autre contrôlant la sortie qui est normalement ouverte. Un dispositif permet de basculer la mise sous tension entre les deux couples de vannes en fonction du niveau de liquide dans les deux réservoirs. Le niveau maximum est fixé pour chacun des réservoirs par deux sondes de niveau en acier inoxydable ; lorsque les deux sondes sont en contact avec le liquide, le système de contrôle fait basculer la mise sous tension des vannes. Les vannes qui étaient ouvertes se ferment et celles qui étaient fermées s'ouvrent. Le réservoir qui était sous pression atmosphérique passe en surpression et vice versa.

Une membrane hydrophobe en Téflon, de seuil de coupure de 0,2 μm , est placée à l'entrée du gaz de chaque réservoir pour assurer la stérilité.

Le module de filtration à fibres creuses est fourni par la société Polymem SA (Fourquevaux, France). Les fibres en polysulfone sont en forme de U et maintenues ensemble à la base par une résine Epoxy. La base du module est confinée dans un réceptacle métallique et la partie filtrante est en immersion dans le milieu de culture. Les caractéristiques de ce module sont présentées dans le tableau II.1.

Tableau II. 1. *Caractéristiques du module fibres creuses de filtration du milieu de culture en BRM.*

Diamètre nominal des pores	0,1 μm
Diamètre interne des fibres	0,25 mm
Diamètre externe des fibres	0,43 mm
Nombre de fibres	1314
Longueur utile des fibres	0,09 m
Surface interne	0,107 m^2
Surface externe	0,156 m^2

➤ Conditions de travail

Pour réussir le déroulement des cultures mixtes, les conditions suivantes doivent être remplies :

1- l'homogénéité du milieu (cf. § 3.2.3.2 chapitre I)

2- le volume moyen du liquide dans chaque réservoir doit être le même

3- la membrane doit être inerte vis-à-vis du soluté du milieu et des micro-organismes. De plus, la quantité des cellules adsorbées ou piégées dans la membrane devra être négligeable par rapport à la population totale. Cela est indispensable pour que la détermination quantitative de leur concentration soit correcte.

2.2. Méthodes analytiques

2.2.1. Mesure de biomasse

Densité optique

La densité optique (DO) des échantillons est mesurée à 620nm par un spectrophotomètre en utilisant une cuvette en quartz de 2 mm d'épaisseur. Pour obtenir la linéarité entre la DO_{620nm} et la concentration cellulaire, il faut que la DO_{620nm} soit inférieure à 0,8. Sinon, il faut diluer l'échantillon.

Dénombrement des bactéries

La méthode de dénombrement en milieu solide qui consiste à ensemer dans la masse a été utilisée. Tout d'abord, on réalise des dilutions décimales de la culture dans de l'eau physiologique, allant de 10^{-4} à 10^{-7} selon la croissance de la souche. Ensuite, un volume de 1 mL de la culture diluée est dispersé dans le fond d'une boîte de Pétri, puis le milieu de culture gélosé est coulé par-dessus à 45°C. Deux boîtes par dilution sontensemencées et l'incubation se fait à 28°C pendant 5 à 7 jours.

Pour la lecture, les colonies développées dans les boîtes sont comptées. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont interprétables.

Le résultat est donné par la formule suivante :

$$X \text{ (UFC/ml)} = \frac{\sum (\text{colonies} \times \text{dilution})}{n}$$

Avec n le nombre de boîtes comptées

UFC : Unité Formant Colonie

2.2.2. Dosages enzymatiques

2.2.2.1. Dosages de l'acide L-malique

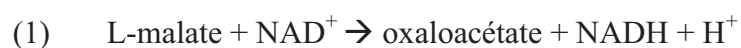
Le dosage enzymatique a été fait grâce à l'automate 'Mascott' (Lisabio, Morangis-France). Cette machine est équipée d'une pompe péristaltique pour mélanger les réactifs enzymatiques avec l'échantillon (460 µl pipeté dans un godet). Un spectrophotomètre mesure l'absorbance du mélange après réaction dans ce godet. Une aiguille automatisée permet de prélever et injecter les quantités précises de réactifs. Une gamme étalon pour chaque type de dosage est préalablement réalisée et enregistrée dans le programme de dosage correspondant. Les différentes concentrations de la molécule dosée (substrat ou produit) sont calculées par rapport à la gamme étalon et directement affichées sur l'écran de la machine.

Principe du dosage

En présence de nicotinamide-adenine-dinucléotide (NAD⁺), l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par la L-malate déshydrogénase (L-MDH).

L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens L-malate → oxaloacétate.

En présence du L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate (2) par la glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT).





La formation de NADH, H^+ , mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de L-malate consommée.

Composition du kit (Microdom, kit no 110 05 011 00)

Flacon 1 (30 mL) : Tampon en solution.

Flacon 2 (6 mL) : NAD^+ en solution.

Flacon 3 (0,8 mL) : Suspension de GOT

Flacon 4 (0,8 mL) : Suspension de L-MDH

Flacon 5 (4 mL) : solution standard d'acide malique $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

Ces réactifs sont mélangés dans les proportions suivantes :

5 mL du flacon 1

1 mL du flacon 2

0,13 mL du flacon 3

0,13 mL du flacon 4

14 mL d'eau distillée.

Une gamme étalon d'acide L-malique allant de 0 à 6 g.L^{-1} a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

2.2.2.2. Dosage de l'acide citrique

Principe du dosage

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citratélyase (1).



En présence de L-malate déshydrogénase MDH (2) l'oxaloacétate est réduit en L-malate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH).



Au cas où l'oxaloacétate décarboxylase est présente, une petite partie de l'oxaloacétate est transformée en pyruvate. En présence du L-lactate déshydrogénase LDH (3), ce pyruvate est réduit en L-lactate



La quantité de NADH oxydé en NAD^+ est proportionnelle au citrate présent dans l'échantillon.

L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorption à la longueur d'onde de 340 nm.

Composition du kit (Microdom no 110 05 036 00)

Flacon 1 : 72 mL de tampon Tris/L-LDH/L-MDH.

Flacon 2 : 8 mL de chromogène (solution NADH)

Flacon 3 : 80 mL de blanc échantillon

Flacon 4 : citrate lyase

Flacon 5 : 5 mL d'une solution pour l'enzyme citrate lyase

Flacon 6 : 10 mL d'une solution étalon d'acide citrique 0,8 g/L

Reconstitution du mono-réactif de travail

1- Reconstitution de la solution de travail chromogène : 18 mL de tampon + 2 mL de chromogène. Solution stable 2 semaines entre 4 et 8 °C.

2- Solution starter de citrate lyase : 1 flacon de citrate lyase + 1 mL de solution pour citrate lyase. Solution stable 1 semaine entre 4 et 8 °C ou 4 semaines à -20 °C.

3- Le mono-réactif de travail est finalement préparé en mélangeant 1 mL de citrate lyase reconstitué avec 20 mL de la solution de travail chromogène.

2.2.2.3. Dosage du glucose et du fructose

Principe du dosage

Le glucose est transformé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase en présence d'ATP. Le glucose-6-phosphate est oxydé en gluconate-6-Phosphate par la G-6-P déshydrogénase en présence de NAD^+ réduit en NADH , H^+ . La quantité de NADH formé est proportionnelle à la quantité de glucose consommé. La formation de NADH est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Le dosage du fructose nécessite une étape supplémentaire. En fait, l'hexokinase transforme le fructose en fructose-6-P. Le fructose-6-P est isomérisé en glucose-6-P par la glucose-6-phosphate isomérase avant d'être oxydé par le G-6-P déshydrogénase.

Composition du kit

Réactif 1: ATP, NAD

Réactif 2: hexokinase, glucose-6-phosphate déshydrogénase

Réactif 3: phosphoglucose isomérase

2.3. Calculs des paramètres cinétiques de la FML

Lissage des données expérimentales

Dans l'objectif d'évaluer les vitesses et les activités spécifiques (croissance et FML) des bactéries, les données expérimentales des cinétiques de la FML ont été lissées avec une fonction spline cubique (Reinsch, 1967). Cette fonction $g(T)$ vérifie pour chaque couple de points expérimentaux (T_i , X_i) les conditions :

$$\int_{T_0}^{T_n} g''(T)^2 dT, \text{ minimum} \quad \text{et} \quad \sum_{i=0}^{i=n} \left(\frac{g(T_i) - X_i}{\sigma(X_i)} \right)^2 < S$$

Avec

X_i : valeur expérimentale de la variable X au temps T_i

T_i : Temps de prise de l'échantillon, compté à partir de l'ensemencement

$\sigma(X_i)$: écart-type lié aux valeurs expérimentales de X

n : nombre total de points expérimentaux

S : constante de lissage

La première condition vise à minimiser $g''(T)$, la dérivée seconde des fonctions de lissage $g(T)$. Ceci rend linéaire les jonctions des courbures les unes entre les autres, générant ainsi des fonctions lisses. La deuxième condition exerce une contrainte sur ce lissage. En effet, la somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne doit pas dépasser la constante 'S'.

Ce lissage est effectué grâce à une macro sur Excel qui permet à l'utilisateur de choisir la constante de lissage et d'examiner son impact sur les courbes en temps réel. En pratique, la constante de lissage doit être choisie conformément aux règles suivantes :

- L'allure de la courbe dérivée $g'(T)$ doit être physiquement cohérente.
- La courbe $g(T)$ ne doit pas dépasser graphiquement les barres d'erreur sur les points expérimentaux.

Vitesse spécifique de croissance μ

A partir des données lissées de la biomasse et de sa dérivée en fonction du temps, la vitesse spécifique de croissance est calculée :

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (h^{-1})$$

Avec

X : biomasse et t: temps

Vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique ν

De même avec le lissage des données expérimentales de concentrations en acide malique et sa dérivée :

$$\nu = \frac{1}{X} \times \frac{d[mal]}{dt} \quad (g L^{-1} h^{-1} OD_{620} \text{ unit}^{-1})$$

Avec

[mal] : concentration en acide L-malique

X : concentration en biomasse mesurée en DO

Vitesse globale de consommation d'acide L-malique

Elle est définie par le rapport entre la quantité d'acide L-malique consommé et sa durée de consommation ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Détermination de la phase de latence

La durée de la phase de latence a été identifiée sur les courbes de vitesses spécifiques de croissance, elle est déterminée par l'intersection de la droite tangente au premier point et la droite tangente au début d'accélération de la vitesse spécifique de croissance.

Variation de la densité optique ΔDO_{620}

Le ΔDO_{620} a été défini comme la différence entre la densité optique maximale atteinte à la fin de la croissance et la densité optique initiale.

Productivité durant la croissance P_g

La productivité (P_g) est le rapport entre ΔDO_{620} et la durée de la phase de croissance après la phase de la latence.

Productivité totale P

La productivité totale a été calculée de la même manière que P_g mais en remplaçant la durée de la phase de croissance par la durée totale, c'est-à-dire en incluant la durée de la phase de latence. Ces 2 productivités P et P_g sont exprimées en unités de $\Delta\text{DO}_{620}.\text{h}^{-1}$.

Chapitre III. Résultats et discussions

1. Caractérisation de souches de bactéries lactiques *Ænococcus æni*

Cette partie présente l'évaluation et la comparaison du développement des souches d'*Æ. æni* A, B, C, D et E dans différentes conditions de croissance :

- d'abord, seront présentés les suivis de croissance des cultures d'inoculum (pH 4,8 ; 5 % d'éthanol ; 28°C) en fioles d'Erlenmeyers.
- ensuite, nous exposerons les résultats de suivis de la croissance des souches en fioles d'Erlenmeyer dans le milieu FML (pH 3,5 ; 10 % d'éthanol ; 20°C). Ces cultures ont été réalisées sous atmosphère ambiante et seront qualifiées de micro-aérobie.
- puis, nous avons réalisé les suivis cinétiques dans le Bio-Réacteur à Membrane sous atmosphère d'azote (nommés anaérobie par la suite) dans le milieu FML. La comparaison avec les cultures micro-aérobies permettra d'évaluer l'effet de la micro-oxygénation sur la croissance des souches. Nous avons également suivi la consommation de l'acide L-malique dans les conditions d'anaérobioses. Suite à ces essais, les activités spécifiques de croissance et de consommation d'acide L-malique ont été reliées par une équation mathématique.
- finalement, l'influence de la présence ou de l'absence de l'acide L-malique sur la croissance de chacune des souches a été évaluée.

Par ailleurs, des répétitions indépendantes de suivis cinétiques de la croissance et de la consommation d'acide L-malique ont été réalisées dans le milieu FML. Les écarts type ne dépassent pas 20 % de la moyenne des répétitions pour la croissance et 14 % pour la consommation d'acide L-malique.

1.1. Cinétiques de croissances pour les différents milieux

1.1.1. Suivi de la croissance dans le milieu d'inoculum

Nous avons rapporté en paragraphe I.2.2.7 que les bactéries *Æ. æni* indigènes s'acclimatent naturellement aux concentrations croissantes de l'éthanol produit au cours de la

fermentation alcoolique dans le milieu vin. Certaines des pratiques actuelles de vinification procèdent à l'acclimatation des levains sélectionnés avant l'inoculation. En effet, cela permet aux cellules d'acquérir une certaine résistance à l'éthanol. Pour cela, l'inoculum est préparé dans un milieu à seulement 5 % d'éthanol (v/v). Nous avons évalué les capacités de croissance des souches dans un tel milieu, le but étant également de déterminer la durée de croissance pour chaque souche dans ce milieu afin de déterminer le temps et la quantité d'ensemencement de notre milieu FML. Les résultats sont présentés sur la figure III.1.

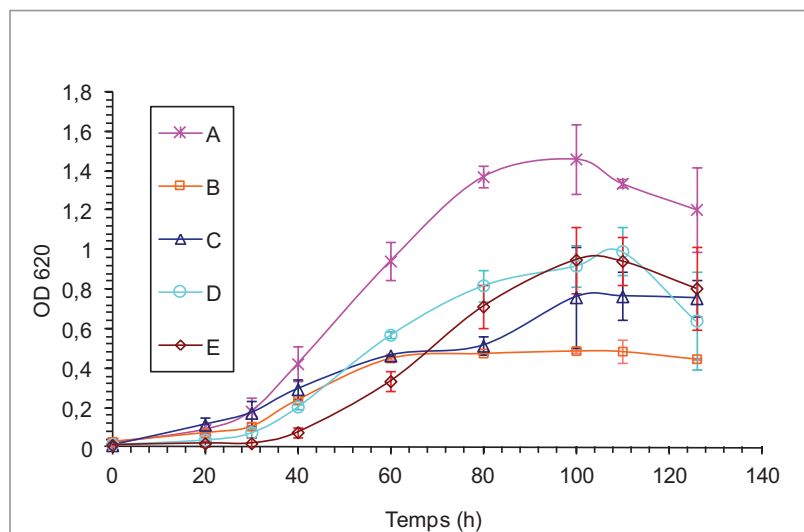


Figure III. 1. Croissances des inoculums des souches d'*CE. æni* A, B, C, D et E en fioles d'Erlenmeyer dans le milieu d'inoculum (28°C ; pH 4,8 ; 5 % d'éthanol en conditions de micro-aérobiose). Moyennes et écarts-types de 3 répétitions pour chaque souche.

Dans les conditions du milieu d'inoculum, les 5 souches de bactéries se développent et atteignent leurs biomasses maximales entre 60 h et 100 h ; elles sont de 0,5 à 1,45 unités de DO_{620} . Bien que ces 5 souches présentent des profils relativement similaires, la souche A se distingue par la biomasse la plus élevée et la souche B par la plus faible. Les souches A, B et E présentent une phase de latence, contrairement aux souches C et D qui se développent instantanément (Tableau III.1). La productivité hors phase de latence (P_g) de la souche C est similaire à celle de la B et est 2 fois plus faible que celle de la souche A. Les souches D et E ont les mêmes productivités totales (P) et ont atteint les mêmes vitesses spécifiques de croissance μ_{max} . Bien que la souche A ait une meilleure croissance, son μ_{max} est relativement proche de celui de la souche B dont la productivité totale est 2,2 fois plus faible. Par

conséquent, il existe donc une variabilité de la croissance de ces souches de bactéries, bien qu'elles présentent des profils de croissance relativement similaires.

Tableau III. 1. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d'*C. œni* dans le milieu inoculum en fioles d'Erlenmeyer.

Souche	A	B	C	D	E
Durée de la phase de latence (h)	5	7	0	0	22
ΔDO_{620}	1,43	0,47	0,75	0,98	0,95
$\mu_{\max} (h^{-1}) \times 10^2$	8,5	6,3	46	11	11
P (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	149	67	75	94	95
P_g (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	157	75	75	94	122

Les cultures dans ce milieu inoculum servent de milieu d'acclimatation pour les cultures de la FML à 10 % d'éthanol (paragraphes suivants). Leur caractérisation a permis de déterminer le temps d'incubation de l'inoculum pour chaque souche: 60 h pour la souche A, 50 h pour la souche B et 80 h pour les souches C, D et E.

Dans le but d'étudier l'activité spécifique de chaque souche, nous avons effectué le calcul des vitesses spécifiques de croissance. Pour ce faire, les valeurs des biomasses expérimentales relevées ont été d'abord lissées (exemple Figure III.2) grâce au programme de « splines cubiques » présenté dans le chapitre Matériel et Méthode.

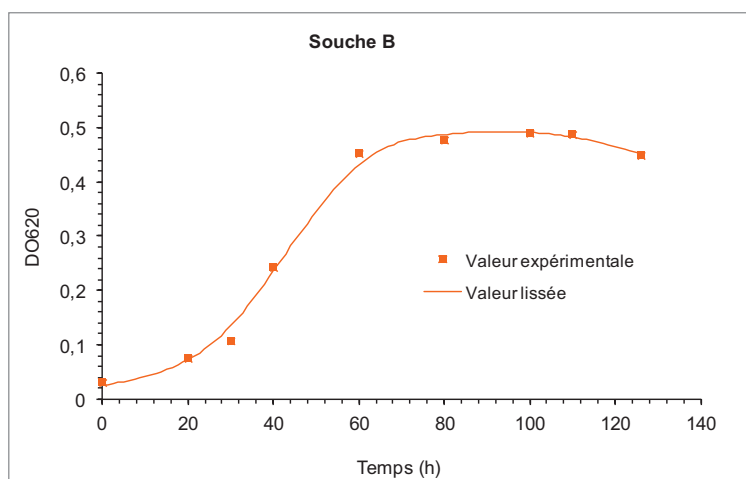


Figure III. 2. Exemple de lissage des données expérimentales de biomasse : souche B en conditions d'inoculum.

Le lissage des valeurs expérimentales permet d'avoir les valeurs instantanées des biomasses au cours du temps, ce qui permet par la suite de calculer les vitesses de croissances instantanées par dérivée mathématique. Les vitesses spécifiques sont ensuite calculées en divisant les vitesses instantanées par les biomasses lissées (Figure III.3).

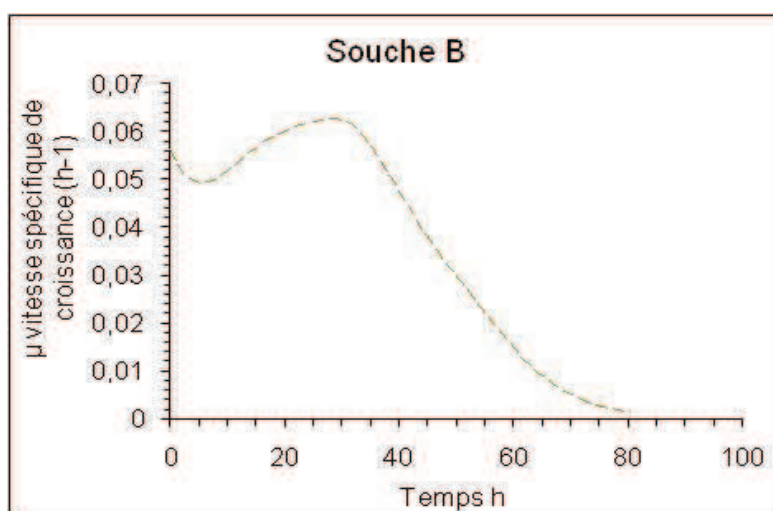


Figure III. 3. Exemple du profil de la vitesse spécifique de croissance (μ) de la souche d'*C. coli* B dans le milieu d'inoculum en fioles d'Erlenmeyer.

1.1.2. Cinétiques de croissance dans le milieu de la FML en fioles d'Erlenmeyer

La figure III.4 présente les cinétiques de croissance de chacune des souches d' *C. œni* A, B, C, D et E cultivée en fiole d'Erlenmeyer dans le milieu FML. Trois types de comportements sont distingués. Un concerne les souches B et E qui présentent une courte phase de latence (20 et 5h) suivie d'une augmentation rapide de la biomasse jusqu'à environ 0,25 unités de DO, puis d'une stabilisation de la concentration en biomasse. Un autre comportement a été observé chez les souches A et D : croissance lente et continue sans phase de latence ni de stabilisation durant toute l'expérience. La souche A se développe mieux que la souche D avec une augmentation de DO de 0,137 contre 0,071 (Tableau III.2). Le troisième type de profil de croissance a été remarqué chez la souche C. Il montre une très longue phase de latence de 200 h, suivi d'une augmentation rapide de la DO. A la fin de l'expérience, après 600 h, la stabilisation de la croissance n'a pas encore été atteinte pour cette souche.

Du point de vue de la productivité totale (P), les souches E et B sont les meilleures, suivies par les souches A et C et puis D. Si l'on considère la productivité obtenue durant la phase de croissance, c'est-à-dire sans la phase de la latence durant laquelle les souches s'adaptent aux conditions du milieu, les positions des souches A et C sont inversées (Tableau III.2).

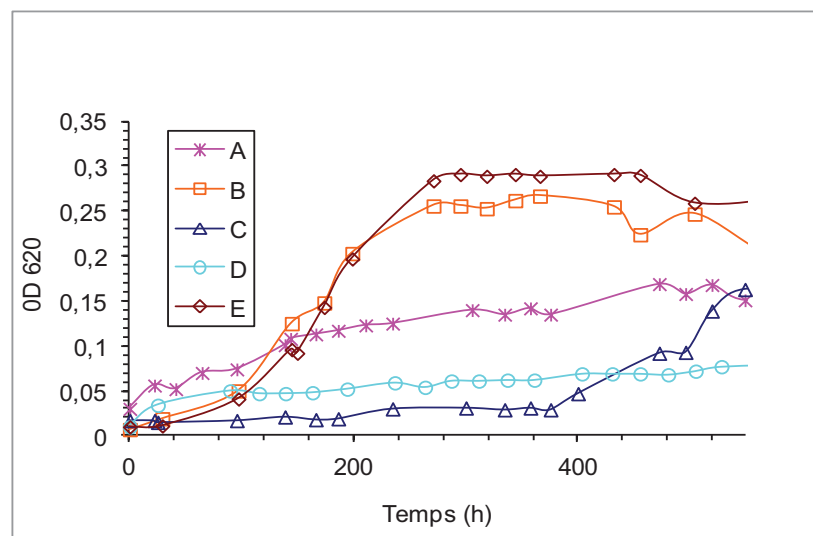


Figure III. 4. Croissance des souches A, B, C, D et E d'*C. œni* dans le milieu de fermentation FML en fioles d'Erlenmeyer (20°C ; pH 3,5 ; 10 % d'éthanol en condition de micro-aérobie).

Tableau III. 2. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d'*C. œni* dans le milieu de fermentation FML en fioles d'Erlenmeyer.

Souche	A	B	C	D	E
Durée de la phase de latence (h)	0	20	200	0	5
ΔDO_{620}	0,137	0,243	0,143	0,071	0,281
$\mu_{\max} (h^{-1}) \times 10^2$	0,9	2,2	0,86	1,2	2,1
P (unite de $DO_{620} \cdot h^{-1}$) $\times 10^4$	3	9	2,6	1	9,5
P_g (unite de $DO_{620} \cdot h^{-1}$) $\times 10^4$	3	9,3	4,1	1	9,7

1.1.3. Cinétiques de croissance en condition anaérobie dans le BRM

La figure III.5 montre les profils de croissance de toutes les souches en conditions anaérobies strictes dans le BRM dans le milieu FML. L'allure globale est similaire : présence d'une phase de latence, suivie par une augmentation de DO sans atteindre de phase stationnaire avant la fin de la fermentation (épuisement de l'acide malique). Cependant, La durée de la phase de latence varie entre 70 et 160 h selon les souches. Nous pouvons remarquer que pour les souches D et E, la DO_{620} initiale décline après l'inoculation (Figure III.5). Ces deux souches semblent éprouver plus de difficultés pour s'adapter aux conditions du milieu de culture par rapport à l'inoculum : concentration plus élevée en éthanol, pH et température plus bas, atmosphère d'azote au lieu d'air.

Les souches A, B et C présentent des cinétiques de croissance similaires avec un meilleur développement que les souches D et E. Ces dernières, bien que possédant les vitesses spécifiques de croissance les plus élevées, présentent les plus faibles variations en densité optique DO_{620} (Tableau III.3). Dans ces conditions anaérobies, la productivité totale (P) et la productivité durant la croissance (P_g) ont abouti à la même classification : la souche A est la meilleure puis viennent ensuite les souches C, B, E et D.

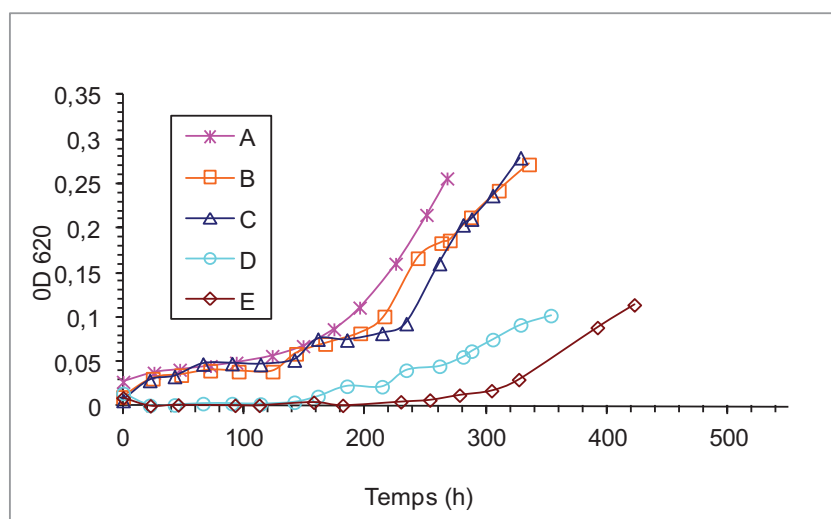


Figure III. 5. Croissance des souches A, B, C, D et E d'*C. œni* dans le milieu de fermentation FML en BRM (20°C ; pH 3,5 ; 10 % d'éthanol en condition anaérobie).

Tableau III. 3. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E d'*C. œni* dans le milieu de fermentation FML en BRM.

Souche	A	B	C	D	E
Durée de la phase de latence (h)	90	78	95	70	160
ΔDO_{620}	0,23	0,156	0,192	0,061	0,104
$\mu_{\max} (h^{-1}) \times 10^2$	1,2	1,1	1,3	2,6	3,3
P (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	8,6	6,44	6,8	2	2,5
$P_g (unite de DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	13	9,5	10	2,6	4

1.1.4. Comparaison des croissances des souches pour les trois conditions

Dans les conditions de culture d'inoculum (5% d'éthanol ; pH 4,8 et 28°C), les souches se sont bien développées et ont atteint rapidement des biomasses élevées contrairement à celles obtenues dans le milieu FML. En effet, après l'acclimatation, l'effet négatif des conditions de la FML (10 % d'éthanol, 20°C et pH 3,5) est très net sur la croissance de toutes les souches étudiées, que ce soit en condition de micro-aérobiose ou en anaérobiose.

Dans le but d'évaluer l'effet de la présence d'oxygène sur *CE. æni*, nous avons effectué la comparaison de la croissance des souches sous les 2 conditions micro-aérobie et anaérobie. Pour toutes les souches, la phase de latence augmente en conditions d'anaérobiose. Ceci peut s'expliquer par le fait que la préparation des inoculums a été réalisée en conditions de micro-aérobie et donc que les cellules ont besoin d'une phase d'adaptation plus longue aux conditions d'anaérobioses. Le tableau III.4 regroupe les résultats de la croissance des souches dans les 3 différentes conditions de culture. Si l'on considère à la fois les 2 critères, la productivité durant la croissance (P_g) et la productivité totale (P), les souches A, C et D ont une meilleure croissance en anaérobie qu'en micro-aérobie. La souche B a des P_g similaires dans les 2 conditions et la souche E a une diminution de P_g (presque de moitié). En conséquence, les croissances des souches A, C et D sont favorisées par des conditions d'anaérobiose tandis que celles des souches B et E sont favorisées par des conditions de micro-aérobie.

En ce qui concerne la comparaison entre le milieu inoculum et le milieu FML en micro-aérobie, toutes les souches ont été favorisées par les conditions moins stressantes de l'inoculum (moins d'éthanol, pH et température plus élevés). A titre d'exemple, pour les souches B et E, les μ_{max} atteints en milieu d'inoculum sont respectivement 2,9 et 5 fois plus élevés que celles obtenues en milieu de la FML et les productivités totales (P) ont été 7,4 fois et 10 fois plus élevées (Tableau III.4).

En comparant pour chacune des souches les productivités totales (P) avec les productivités durant la phase de croissance (P_g) dans les conditions d'inoculum et les conditions de la FML (micro-aérobie et anaérobie) l'impact de la phase de latence peut être estimé. En condition d'anaérobiose, toutes les souches ont un écart entre les productivités P et P_g . Respectivement pour les souches A, B, C, D et E, les productivités P_g sont 1,51 ; 1,48 ; 1,51 ; 1,29 et 1,6 fois plus élevées que les productivités P. Ces écarts sont dus aux durées des phases de latence.

L'ensemble de ces résultats montre la grande variabilité entre souches au sein de l'espèce *CE. æni* par rapport aux conditions de croissance.

Tableau III. 4. Récapitulatif comparant les paramètres de croissances ; vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{max}), productivité totale (P) et productivité durant la phase de croissance (P_g) dans les différentes conditions de culture des souches d'*C. œni* A, B, C, D et E.

Souche		A	B	C	D	E
Micro-aérobie, FML en fioles d'Erlenmeyer	$\mu_{max} (h^{-1}) \times 10^2$	0,9	<u>2,2</u>	0,86	1,2	<u>2,1</u>
	P (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	3	<u>9</u>	2,6	1	<u>9,5</u>
	P_g (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	3	<u>9,3</u>	4,1	1	<u>9,7</u>
FML en anaérobiose dans le BRM	$\mu_{max} (h^{-1}) \times 10^2$	<u>1,2</u>	1,1	<u>1,3</u>	<u>2,6</u>	3,3
	P (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	<u>8,6</u>	6,4	<u>6,8</u>	<u>2</u>	2,5
	P_g (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	<u>13</u>	9,5	<u>10</u>	<u>2,6</u>	4
Inoculum	$\mu_{max} (h^{-1}) \times 10^2$	8,5	6,3	46	11	11
	P (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	149	67	75	94	94,8
	P_g (unite de $DO_{620}.h^{-1}) \times 10^4$	157	75	75	94	122

➤ Discussion

Les bactéries d'*C. œni* résistent différemment aux conditions principales de stress dans le vin à savoir le pH, l'éthanol et la température.

- Lonvaud-Funel et *al.* (2010) expliquent que la différence entre les souches est liée à leur capacité plus au moins grande à maintenir un pH intracellulaire compatible avec le fonctionnement des voies métaboliques.
- L'éthanol exerce son effet toxique directement sur la membrane plasmique en modifiant sa fluidité et l'environnement des protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie des cellules et dans le transport membranaire.
- La température affecte la vitesse des réactions biochimiques de la cellule et donc la vitesse de multiplication. Bien que 20°C soit la température optimale pour la vinification, elle est faible pour nos conditions de culture où l'optimum de croissance se situe entre 25°C et 30°C.

La résistance à ces conditions peut devenir plus délicate par synergie d'effets négatifs de ces 3 paramètres importants (cf. paragraphe 2.2 du chapitre I).

D'après ces données bibliographiques, on constate que tous les facteurs (pH, éthanol et température) affectent d'abord la membrane plasmique, structure de protection et de sélection des molécules traversant la membrane vers le cytoplasme ou vers l'extérieur de la cellule. Les principales composantes qui assurent ces mécanismes se situeraient essentiellement au niveau de la membrane cytoplasmique qui détermine en grande partie la vie d'une cellule. Cela laisse penser que les différences de croissance observées chez les souches A, B, C, D et E pourraient être liées à des différences au niveau de cette membrane. Les travaux de thèse de Garbay (1994) ont ainsi focalisé sur l'évaluation du comportement de la membrane plasmique vis-à-vis des conditions défavorables du vin. Comparant des bactéries d'*Œ. œni* adaptées au vin et d'autres non adaptées à ce milieu, deux hypothèses ont été discutées :

1) l'adaptation au vin d'*Œ. œni* résiderait dans la capacité des cellules à maintenir l'intégrité membranaire par des modifications juste nécessaires et suffisantes de la composition en acides gras, en lipides et en protéines.

2) La facilité de l'ATP-ase membranaire d'*Œ. œni* à s'adapter aux conditions extracellulaires et à réguler son niveau d'activité par des modifications structurales appropriées.

Les conclusions ont été que les cellules vivantes, qui résistent aux conditions de stress, sont capables de modifier radicalement la constitution de leur membrane plasmique pour faire face aux agents toxiques de l'environnement.

En ce qui concerne la croissance des 5 souches cultivées dans les deux conditions, micro-aérobie et anaérobie, les résultats obtenus confirment les contradictions relevées dans la littérature par rapport au développement d'*Œ. œni*. Le développement (ΔDO_{620}) et les productivités totales atteintes par les souches A, C et D ont été plus élevés sous atmosphère d'azote, tandis que celles obtenues dans le cas des souches B et E ont été plus élevés dans les conditions de micro-aérobie.

Outre les trois facteurs de stress déjà mentionnés (pH, température et éthanol), la présence de l'oxygène est un autre facteur qui pourrait influencer la FML et la croissance de ces bactéries lactiques. Les travaux de Nehme (2008) ont montré que la souche X d'*Œ. œni* se développait mieux en conditions anaérobie (sous azote ou sous CO₂) qu'en conditions sous air. Tataridis

(2001) a également comparé les cinétiques et les rendements de croissance de la souche d'*Æ. œni* 17A3 cultivée sous air et sous CO₂. En revanche, une réduction de la durée de la fermentation a été observée (102 h au lieu de 125 h sous air), une biomasse maximale presque doublée a été obtenue et une amélioration de la productivité et du taux spécifique de croissance des cellules ont été constatés. De même, Peynaud (1981) a noté que le remontage à l'air, en vinification en rouge, était toujours positif pour le déclenchement de la FML. Par ailleurs, des travaux ont montré que le gène *trxA* codant la thioredoxine, protéine dotée d'activité antioxydante, a été trouvé transcrit chez *Æ. œni*; de plus une augmentation significative des niveaux de son ARNm a été observée en présence d'H₂O₂ ou après un choc thermique (Jobin et al. 1999). Chez *Lactococcus Lactis*, Sanders et al. (1995) ont rapporté que la ventilation induit l'expression du gène *sodA* en un superoxyde dismutase pour la dismutation des radicaux libres de l'oxygène, qui endommage les cellules. La différence observée entre les souches, en conditions d'anaérobiose et de micro-aérobiose, pourrait être expliquée par de tels mécanismes. Autrement dit, il se peut que certaines souches possèdent ces mécanismes antioxydants et d'autres souches sont dépourvues de ces systèmes.

En conclusion, une grande variabilité a été remarquée entre les souches étudiées. Il est alors difficile de déterminer des conditions optimales pour les cultures. Nous avons choisi pour l'étude de la fermentation malo-lactique de nous placer dans les conditions les plus proches d'une FML classique ayant lieu après la fermentation alcoolique, c'est-à-dire lorsque l'oxygène dissous du moût est épuisé. Pour ces raisons, la consommation d'acide L-malique a été étudiée dans les conditions d'anaérobiose, en BRM, avec le milieu FML.

1.2. Cultures en conditions anaérobiose : suivi des substrats

1.2.1. Consommations de glucose, fructose et d'acide citrique

Les dosages des concentrations en glucose en début et fin de FML montrent que, pour toutes les souches, celui-ci n'est pas du tout consommé (Tableau III.5). Le fructose et l'acide citrique en revanche ont été consommés en des quantités variables par les souches A, B, C, D et E. Aucun de ses substrats n'est cependant épuisé à la fin de la FML.

Tableau III. 5. Consommation de glucose, de fructose et d'acide citrique par les souches A, B, C, D et E dans le milieu de la FML en condition anaérobie.

Souche	Glucose consommé (g.L ⁻¹)	Fructose consommé (g.L ⁻¹)	Acide citrique consommé (g.L ⁻¹)
A	0	0,24	0,97
B	0	0,87	0,23
C	0	0	0,62
D	0	0,40	0,24
E	0	0,63	1,17

1.2.2. Cinétiques de consommation d'acide L-malique

1.2.2.1. Dégradation de l'acide L-malique

La figure III.6 montre les profils de consommation d'acide L-malique : pour toutes les souches, la consommation d'acide L-malique est très lente au début, puis elle s'accélère. Elles consomment toutes la totalité de l'acide L-malique initialement présent dans le milieu de culture, c'est-à-dire 4 g.L⁻¹. La souche B a été la plus rapide en terminant la FML en 242 h, la souche E la plus lente en 422 h. Les souches A, B, C et D ont eu des vitesses globales de consommation d'acide L-malique similaires, entre 1,33 et 1,55×10⁻² g.L⁻¹.h⁻¹, alors qu'elle était seulement de 0,95 pour la souche E (Tableau III.6). Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la souche A a été la plus rapide à se développer ; pourtant, elle achève la FML après la souche B. De même, bien que les souches B et C aient des profils de croissance très similaires (Figure III.5), la consommation d'acide L-malique par la souche C est terminée 39 h plus tard par rapport à la souche B. Les souches D et E requièrent également moins de biomasse que les autres pour accomplir la FML (Figure III.5 et III.7). Encore, la comparaison entre productivités en biomasses (P et P_g) et vitesses globales de consommation d'acide L-malique montre l'absence de proportionnalité entre ces 2 paramètres d'une souche à l'autre. Entre souches, il n'y a donc pas de lien direct entre la quantité de biomasse et la durée de la FML.

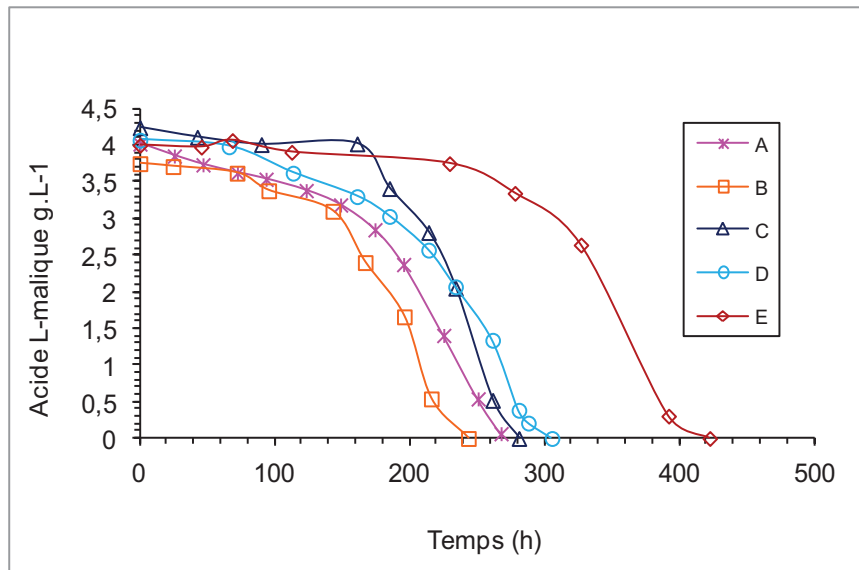


Figure III. 6. Consommation d'acide L-malique des souches A, B, C, D et E d'*C. acetobutylicum* dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.

Tableau III. 6. Paramètres de consommation d'acide L-malique, des souches d'*C. acetobutylicum* A, B, C, D, et E dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.

Souche	A	B	C	D	E
Durée de la consommation d'acide L-malique (h)	267	242	281	305	422
Vitesse globale de consommation d'acide L-malique ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) $\times 10^2$	1,51	1,55	1,48	1,33	0,95
v_{max} Vitesse spécifique maximale de consommation d'acide L-malique ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{unité de DO}_{620}^{-1}$)	0,24	0,42	0,4	1,74	1,95

1.2.2.2. Vitesses spécifiques de croissance et vitesses spécifiques de consommation d'acide L-malique

La figure III.7 montre que pour toutes les souches la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique et la vitesse spécifique de croissance (v and μ) ont le même profil. Premièrement, au cours de la phase de la latence, il y a une légère diminution de la

consommation spécifique d'acide L-malique et de la croissance spécifique ; elle est bien marquée dans la consommation d'acide L-malique par la souche A. Cette diminution pourrait être le résultat du choc dû à la différence entre les conditions de cultures d'inoculum et les conditions de la FML (pH, éthanol, température et anaérobiose) durant le début de la phase de latence (Figure III.7). Deuxièmement, une nette augmentation des vitesses spécifiques v et μ a été observée, et les vitesses maximales v_{\max} et μ_{\max} ont été obtenues au début de la phase d'accélération de la croissance (sur les profils de croissance).

Troisièmement, la vitesse v décline, ralentit puis s'annule car l'acide L-malique s'épuise du milieu. Le ralentissement de la vitesse spécifique de croissance μ a été également observé chez toutes les souches mais sa valeur ne s'annule pas à la fin de l'expérience.

Les valeurs des vitesses v et μ sont différentes d'une souche à l'autre, comme nous le remarquons aux Tableaux III.4 et III.6 pour les μ_{\max} et v_{\max} . Pourtant, la vitesse spécifique de croissance (μ) semble varier proportionnellement avec la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique (v). Dans le but de vérifier et quantifier ce lien de proportionnalité un modèle mathématique le représentant a été développé.

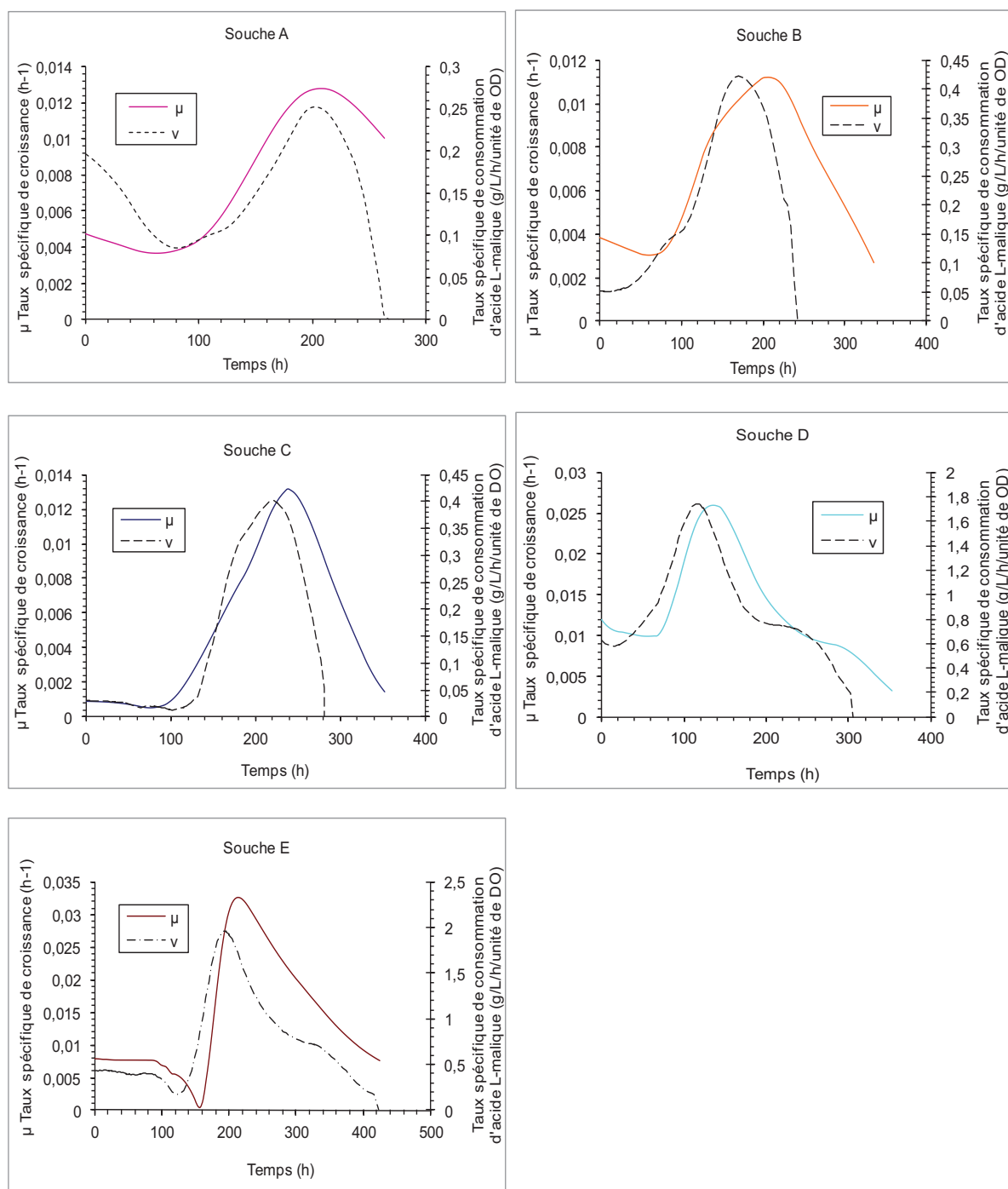


Figure III. 7. Vitesse spécifique de croissance (μ) et vitesses spécifique de consommation d'acide L-malique des souches A, B, C, D et E d'*Æ. æni* dans le milieu FML en condition anaérobie dans le BRM.

1.3. Lien croissance et consommation d'acide malique

1.3.1. Modélisation

La vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique semble être proportionnelle à la vitesse spécifique de croissance. Par ailleurs, à la fin de la consommation d'acide L-malique, la vitesse v diminue certainement en raison de la limitation en acide L-malique. En supposant que les cellules consomment de l'acide L-malique simultanément à la croissance, l'équation représentant ce phénomène a été proposée :

$$v_m = ki \times \mu \times \frac{[mal]}{[kmal] + [mal]}, \text{ avec}$$

- v_m : vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique (g/L/h/unité de DO)
- μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
- $[mal]$: concentration de l'acide L-malique ($g.L^{-1}$).

ki est le paramètre qui représente le coefficient de proportionnalité entre les vitesses v and μ et $kmal$ est le paramètre de la limitation par le substrat (acide L-malique en $g.L^{-1}$). Ces deux paramètres ont été déterminés en minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées des vitesses spécifiques de la consommation d'acide L-malique. Les valeurs obtenues pour chacune des souches A, B, C, D et E sont indiquées dans le Tableau III.7.

Tableau III. 7. Paramètres cinétiques du modèle proposé ki et $Kmal$, des souches d'*E. coli* A, B, C, D, et E dans le milieu FML en condition anaérobie.

Souche	A	B	C	D	E
ki	35,8	54,5	45,7	70,8	62,2
$Kmal$ ($g.L^{-1}$)	1,1	1,23	1,14	0,47	0,8
$\delta t^* (h) = t_{\mu_{max}} - t_{v_{max}}$	0	38	17	21	21

La valeur de k_i de la souche A est la plus faible suivie par celle de la souche C. Le k_i de la souche B est 1,5 fois élevée que celui de la souche A. Les souches D et E ont les k_i les plus élevés, respectivement, 1,98 et 1,74 fois plus élevé que le k_i de la souche A. Par conséquent, la capacité intrinsèque de ces 2 souches à consommer l'acide L-malique est plus élevée par rapport à celles des autres souches A, B et C. Ceci explique la bonne consommation d'acide L-malique par les souches D et E malgré leur croissance qui est lente.

Après avoir déterminé les constantes k_i et k_{mal} pour chaque souche, et en connaissant la concentration initiale de l'acide L-malique dans le milieu de culture, la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique calculée par le modèle (v_m) a été utilisée pour calculer la concentration de l'acide L-malique correspondante à la biomasse expérimentale (x_{exp}) mesurée au cours de la croissance, en utilisant l'équation suivante :

$$v_m = \frac{1}{x_{exp}} \times \frac{\Delta[mal]}{\Delta t}$$

Il est alors possible pour les différents intervalles de temps de déduire la concentration en acide L-malique au cours de la FML et la comparer aux valeurs expérimentales (Figure III.8). Le profil de la concentration d'acide L-malique calculée, pour chaque souche, est semblable au profil expérimental obtenu précédemment. Le modèle proposé semble être bien adapté pour prédire la concentration d'acide L-malique consommée par la bactérie *CE. Ceni* en utilisant les valeurs mesurées de concentrations en biomasse. Il faudrait noter que ce modèle n'est valable que dans nos conditions de milieu (très riche), son utilisation dans des conditions de cultures limitant reste à vérifier.

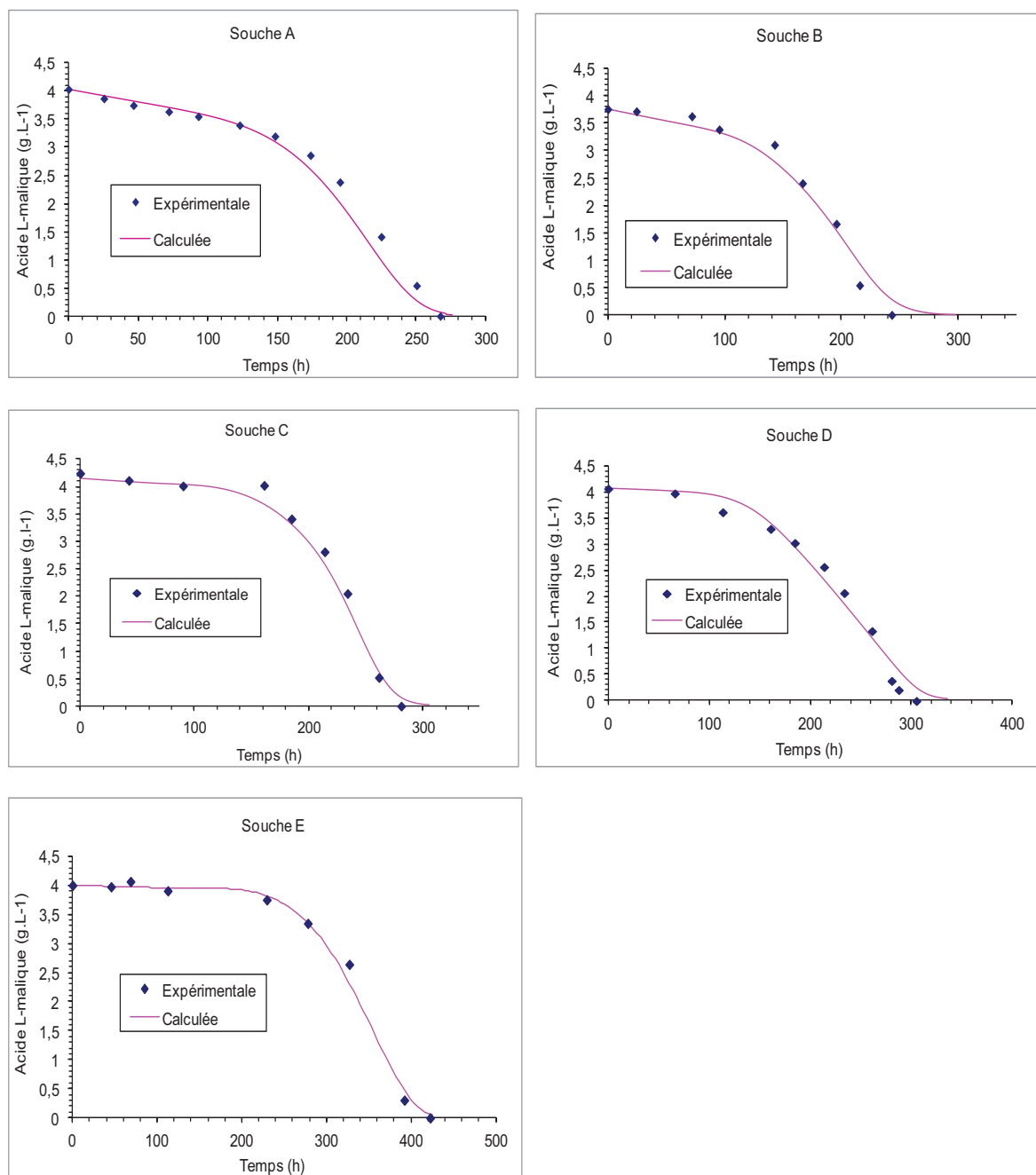


Figure III. 8. Concentrations d'acide L-malique expérimentales et calculées durant les cultures des souches d'*C. œni* A, B, C, D et E en conditions anaérobies.

1.3.2. Discussion sur le lien croissance et assimilation d'acide malique

La figure III.7 montre que pour 4 souches (B, C, D et E), la vitesse spécifique de croissance μ commence à ralentir avec un décalage dans le temps ($t_{\mu_{\max}} - t_{v_{\max}}$) par rapport au déclin de v (Tableau III.7). Ce décalage est toujours dans le sens où le déclin de μ_{\max} intervient après celui de v_{\max} . Ce décalage est absent dans le cas de la souche A. Sa durée est quasiment similaire pour les souches C, D et E, et environ 2 fois plus élevée dans le cas de la souche B. Le décalage observé entre v and μ pourrait être lié au fait que la bactérie *Æ. œni* accumule de l'acide L-malique ou l'énergie produite par sa consommation. Cette énergie peut alors peut-être utilisée pour que la bactérie continue sa croissance après le déclin de v . Ce décalage observé expérimentalement n'a pas été pris en compte dans le modèle proposé. La sensibilité à ce phénomène apparait cependant très faible dans la mesure où la concentration d'acide L-malique calculée est tout de même très proche des valeurs expérimentales.

Pour expliquer la différence entre les durées des décalages observés entre v et μ , nous suggérons que la capacité d'accumulation intracellulaire d'acide L-malique varie selon les souches. En effet, il a été démontré qu'à pH 3,2 (pH moyen du vin) la perméabilité des cellules à l'acide, sous sa forme non dissociée, par simple diffusion pourrait représenter plus de 50 % de l'acide L-malique total assimilé. En revanche, aux pH égal ou supérieur à 4,5 la diffusion passive est négligeable (Tourdot-Maréchal et *al.* 1993). À des pH bas la perméabilité membranaire des cellules augmente, ce qui favorise le transport du L-malate par la diffusion passive. S'il y a accumulation de l'acide L-malique, l'homéostasie cellulaire étant requise (Lonvaud Funel et *al.* 2010), les souches A, B, C, D et E pourraient tolérer différemment la variation du gradient de pH induit par l'entrée du L-malate dans le cytoplasme. La différence entre les souches est alors liée directement à la capacité de chacune à résister, c'est-à-dire leurs capacités à réparer et à réguler de façon continue la structure de la membrane plasmique affectée dans les conditions stressantes.

L'hypothèse émise d'un point de vue moléculaire, est que la réaction malo-lactique fournit de l'énergie par la translocation de la molécule du malate (mono-anion) et de lactate et par la décarboxylation du L-malate qui provoque une alcalinisation du cytoplasme et donc une

augmentation de la différence de pH entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Poolman et al. 1991). Une force proton motrice qui impose le flux du proton H^+ vers l'intérieur de la cellule est alors générée, ce qui permet la synthèse d'ATP via l'ATPase membranaire (Lonvaud et al. 2010). Cela irait dans le sens de l'augmentation de la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique v avant l'augmentation de la vitesse spécifique de croissance μ . Les travaux d'Augagneur et al. (2007) démontrent que la présence du L-malate améliore le rendement de croissance d'*Æ. ãeni* ATCC BAA-1163 (souche A). Dans leurs cultures à pH 5,3 ; 4,5 et 3,2 les valeurs de μ_{max} atteintes pendant la phase exponentielle sans le malate ont été, respectivement : 0,153 ; 0,146 et 0,038. Avec le malate, les μ_{max} ont été 0,135 ; 0,131 ; et 0,042. Le μ_{max} a été légèrement plus élevée en présence d'acide L-malique seulement à faible pH (3,2). Il semble que cette souche utilise le malate lorsqu'elle est soumise aux conditions de stress, le pH dans ce cas. Par ailleurs, Saguir et Manca de Nadra (1997) ont démontré que la présence du L-malate, que ce soit dans le milieu complexe ou dans le milieu synthétique, augmente la croissance de la souche *Leuconostoc œnos* isolée d'un vin argentin. Les mêmes auteurs rapportent que l'acide L-malique pourrait être utilisé comme une source d'énergie additionnelle mais pas comme un précurseur biosynthétique. En effet, en présence du L-malate, la biomasse maximale atteinte en milieu synthétique est 4,5 fois plus faible que celle obtenue en milieu complexe.

Les conclusions issues de ces travaux en ce qui concerne l'effet bénéfique du malate sur la croissance d'*Æ. ãeni* nécessite d'être clarifiée pour nos 5 souches. Le modèle que nous avons proposé a été posé en considérant comme dans la plupart de la littérature que les cellules consomment de l'acide malique parce qu'elles se développent. Pourtant, d'après les observations expérimentales et certains travaux, il se pourrait que ce soit parce qu'elles consomment de l'acide malique que les cellules se développent. Des expériences spécifiques ont été alors menées pour vérifier cette hypothèse.

1.4. Évaluation de l'effet de l'acide L-malique sur la croissance des souches

Afin d'évaluer l'effet de la consommation d'acide L-malique sur la croissance d'*Æ. ãeni*, des cultures pures en absence d'acide L-malique ont été réalisées et comparées à des cultures menées dans le même milieu de fermentation mais avec 4g/L d'acide L-malique.

Lors de ces expériences, la consommation d'acide citrique par *Æ. æni*, en présence et en absence d'acide L-malique a été également évaluée.

Ces cultures spécifiques ont été faites pour toutes les souches dans des fioles d'Erlenmeyers en condition anaérobie (sous atmosphère d'azote, agitation à l'aide de barreaux aimantés mais pas de bullage d'azote) en partant du même inoculum pour le milieu avec et sans acide malique. Pour les souches D et E, les mêmes essais ont été aussi réalisés en conditions de micro-aérobie (Erlenmeyers sous air sans agitation).

1.4.1. Effet sur les biomasses

1.4.1.1. Cultures en condition anaérobie

La figure III.9 présente les profils de croissance obtenus en présence et en absence d'acide L-malique dans le milieu de culture. L'analyse de l'effet de l'acide L-malique sur la croissance des souches A, B, C, D et E nous montre qu'elles sont plus productives en présence de cet acide dans le milieu de fermentation. Respectivement, les gains en biomasses en présence d'acide L-malique sont 0,032 ; 0,046 ; 0,072 ; 0,038 et 0,038 de DO_{620} , ce qui représente un gain allant de 106,7 % (souche A) à 130,9 % (souche C) (Tableau III.8). En moyenne, pour l'ensemble des souches, les productivités totales obtenues en présence d'acide L-malique sont 2,2 fois plus élevées qu'en absence de cet acide dans le milieu de fermentation. En revanche, l'évolution des durées des phases de la latence varient selon les souches, en présence et en absence de l'acide L-malique dans le milieu de culture.

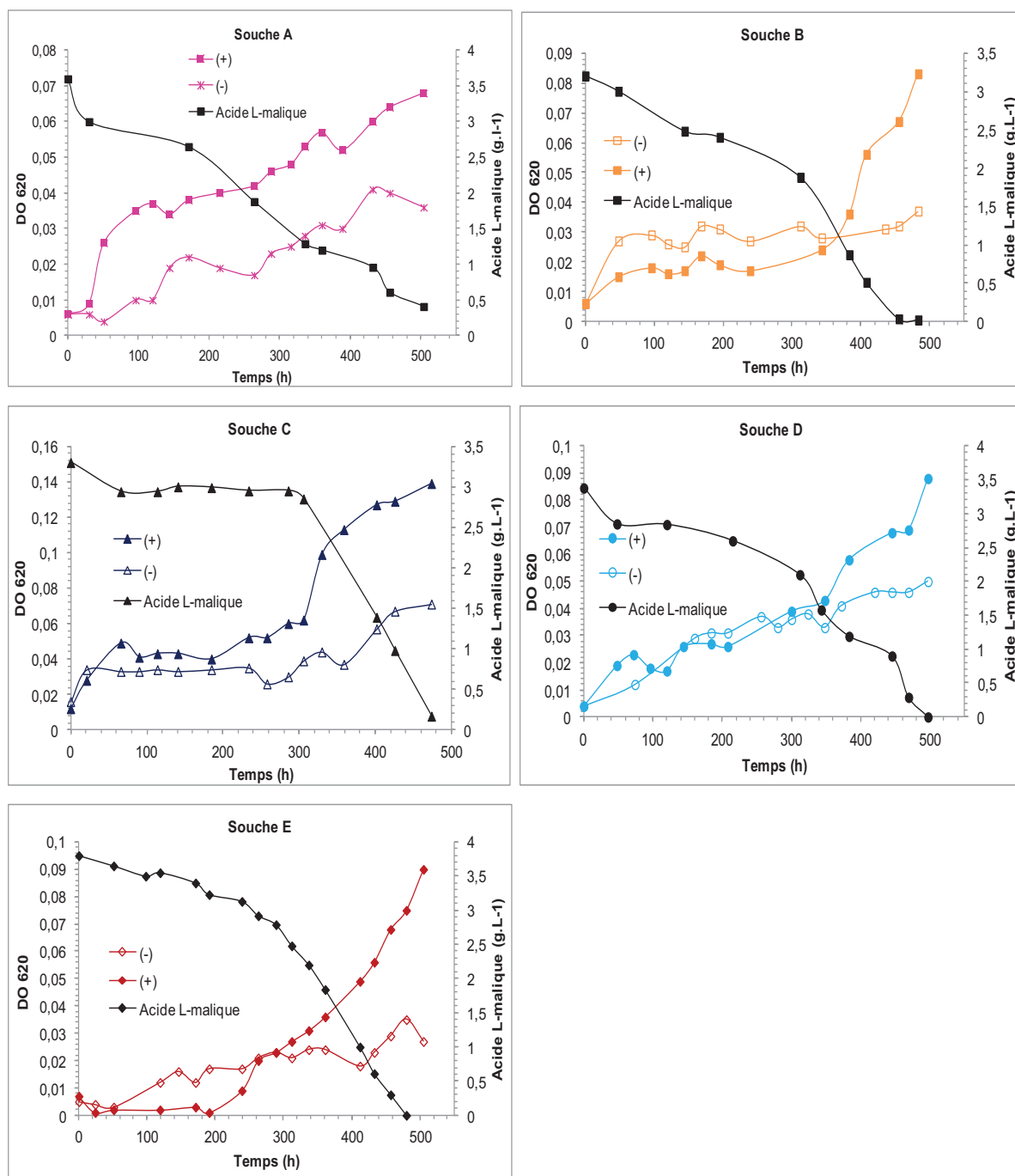


Figure III. 9. Croissance des souches A, B, C, D et E en fioles d'Erlenmeyer, en conditions anaérobies sous azote, en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation et évolution de leurs consommations d'acide L-malique (lorsqu'il est présent).

Tableau III. 8. Paramètres de croissance des souches A, B, C, D et E en présence (+) et en absence (-) de l'acide malique dans le milieu de fermentation, en condition 'anaérobie.

		ΔDO_{620}^*	Productivité P (unité $DO \cdot h^{-1}$) $\times 10^4$	Gain en croissance avec l'acide L- malique
A	+	0,062	1,23	$\times 2,06$
	-	0,03	0,59	
B	+	0,077	1,59	$\times 2,48$
	-	0,031	0,64	
C	+	0,127	2,68	$\times 2,3$
	-	0,055	1,16	
D	+	0,08	1,61	$\times 1,9$
	-	0,042	0,84	
E	+	0,068	1,72	$\times 2,26$
	-	0,03	0,76	

* ΔDO_{620} correspondant à la fin de la FML.

1.4.1.2. Cultures en condition de micro-aérobie

Dans les conditions de micro-aérobie, nous avons évalué l'effet de l'acide L-malique sur la croissance pour deux souches : une favorisée dans les conditions micro-aérobies (souche D) et une favorisée dans les conditions anaérobies (souche E).

- Souche D

La souche D se développe dans le milieu de fermentation avec l'acide L-malique après une longue phase de latence de 340 h (Figure III.10). Dans le milieu sans acide L-malique, sa croissance est très lente tout au long de la culture. Le gain en biomasse de la souche D, en

présence d'acide L-malique dans le milieu de culture, est de 0,028 de DO₆₂₀, soit 40 % de la biomasse atteinte en présence de cet acide (Tableau III.8) et sa productivité est multipliée par 1,67.

- Souche E

Nous avons vu que de la souche E est plus performante en conditions de micro-aérobic qu'en anaérobic (cf. paragraphe 1.1.4 de ce chapitre). L'effet de l'acide L-malique a été donc étudié en conditions de micro-aérobic. Comme en culture sous atmosphère d'azote (cf. 1.4.1.1 de ce chapitre), le développement de la souche en présence d'acide L-malique est meilleur qu'en son absence. Le gain en biomasse obtenu à la fin de la FML représente 165 % de la biomasse obtenue en absence de l'acide L-malique dans le milieu de culture. Par ailleurs, la productivité est multipliée par 2,66 en présence d'acide L-malique dans le milieu de culture.

Pour la souche D les conditions anaérobies sont plus favorables pour la croissance et la durée de la FML qui est raccourcie de 83 h. La présence de l'oxygène semble donc atténuer un peu l'effet positif de l'acide L-malique sur la croissance de cette souche. En revanche, les conditions de micro-aérobic renforcent l'effet positif de l'acide L-malique sur la croissance de la souche E (productivité en biomasse).

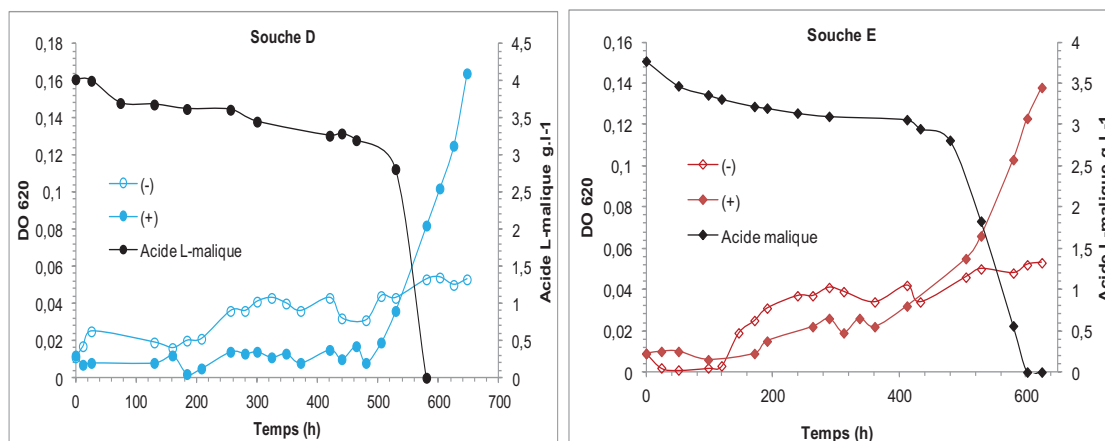


Figure III. 10. Croissance des souches D et E en fioles d'Erlenmeyer, en conditions de micro-aérobic en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation et évolution de la consommation d'acide L-malique en présence de celui-ci dans le milieu.

Tableau III. 9. Paramètres de croissance des souches D et E, en présence (+) et en absence (-) de l'acide L-malique dans le milieu de fermentation, en condition de micro-aérobie.

		ΔDO_{620}	Productivité P (unité $DO \cdot h^{-1}$) $\times 10^4$	Gain en croissance avec l'acide L- malique
D	+	0,070	1,21	$\times 1,67$
	-	0,042	0,72	
E	+	0,114	1,89	$\times 2,66$
	-	0,043	0,71	

1.4.2. Analyses de l'effet sur les activités spécifiques μ et ν

Nous avons montré que pour toutes les souches la vitesse spécifique de croissance (μ) était corrélée à l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique (ν) (cf. paragraphe 1.3 de ce chapitre). Il est donc intéressant ici d'analyser l'évolution des vitesses μ obtenues en absence d'acide L-malique, en comparaison avec les profils obtenus en présence d'acide L-malique.

La figure III.11 montre les profils des vitesses spécifiques de croissance et de consommation d'acide L-malique en conditions anaérobies en fioles d'erlenmeyer. Pour les 5 souches, nous retrouvons logiquement la corrélation entre les 2 vitesses spécifiques qui avait été observée dans les expériences en BRM.

Pour les cultures sans acide L-malique, pour toutes les souches, les vitesses de croissance μ obtenues restent très faibles par rapport à celles obtenues avec l'acide L-malique. Les profils de vitesses spécifiques de croissance sont assez différents suivant les souches : diminution au cours du temps pour les souches A, D, E ; augmentation pour les souches B et C. Cependant les niveaux atteints sont très nettement inférieurs à ceux obtenus lorsqu'il y a consommation d'acide malique. Les mêmes effets ont été constatés chez les 2 souches D et E en condition de micro-aérobies (graphes non montrés).

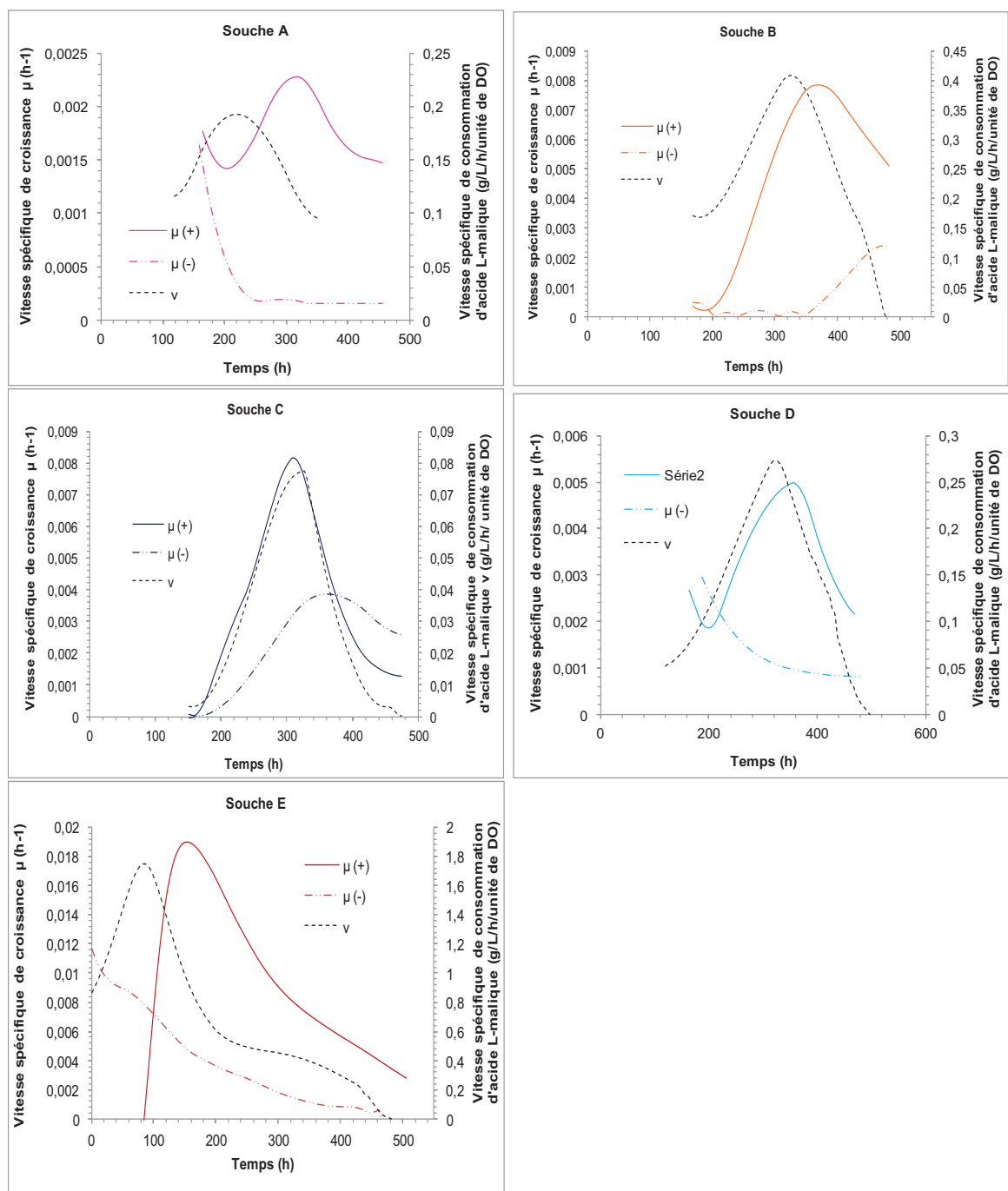


Figure III. 11. Évolution des vitesses spécifiques de croissances (μ) des souches A, B, C, D et E en condition anaérobie, en présence (+) et en absence (-) d'acide L-malique dans le milieu de fermentation. Evolutions de leurs vitesses spécifiques de consommation d'acide L-malique.

1.4.3. Consommation de l'acide citrique

L'évaluation de la consommation de l'acide citrique dans les deux cas, avec et sans acide malique dans le milieu de culture, nous semble intéressant dans le but de voir si ces souches de bactérie métabolisent une quantité plus importante d'acide citrique en absence d'acide L-malique pour assurer leur développement. On rappelle que le milieu en contenait initialement 1.7 g.L^{-1} .

Le tableau III.10 présente les quantités d'acide citrique consommées par les souches en présence et en absence d'acide L-malique. Ces quantités consommées sont équivalentes pour les 2 modalités pour les souches A et E. Une consommation supplémentaire de $0,29 \text{ g.L}^{-1}$ d'acide citrique a été remarquée dans le cas de la souche D en absence d'acide malique malgré une quantité de biomasse beaucoup moins importante. Les souches B et C, au contraire, assimilent des quantités d'acide citrique plus élevées en présence d'acide L-malique qu'en son absence ($0,27$ et $0,13 \text{ g.L}^{-1}$).

Dans les conditions de micro-aérobie, la souche D consomme plus faiblement l'acide citrique en présence d'acide malique mais plus fortement en son absence en comparaison avec l'anaérobiose. Le même comportement est observé pour la souche E en condition de micro-aérobie. En aucun cas l'absence d'acide L-malique conduit à une consommation supplémentaire d'acide citrique.

Il est cependant difficile de conclure sur l'ensemble de ces valeurs étant donné que les quantités de biomasse formées sont très différentes avec et sans acide malique. Les quantités d'acide citrique sont donc difficilement comparables. Aucun phénomène évident ne se dégage de ces valeurs.

L'absence d'acide L-malique du milieu de culture ne conduit donc pas forcément à une consommation supplémentaire d'acide citrique comme on aurait pu le penser. Les connaissances de la littérature sur ce sujet concernent le transport du malate et du citrate qui est supposé se faire par un même et unique transporteur (Alexandre et *al.* (2008)). D'autre part, il a été montré que l'ARNm de ce transporteur était produit davantage en présence de malate dans le milieu (Augagneur et *al.* 2007). Il en résulte que la faible consommation du citrate dans le milieu de culture sans acide L-malique, pourrait être due à la faible production de son transporteur membranaire. En revanche, dans le cas de la souche B par exemple, la quantité d'acide citrique consommée au cours de la FML est 10,55 fois plus faible que la

quantité d'acide L-malique consommée. En d'autres termes, dans un litre du milieu de culture, au cours de la consommation de 24 mmoles d'acide L-malique, uniquement 1,87 mmoles d'acide citrique ont été assimilées. Cela pourrait être expliqué par le transport de l'acide L-malique, à l'intérieur de la cellule, qui se fait plus efficacement que celui de l'acide citrique.

Tableau III. 10. Consommation d'acide citrique des souches *C. xeni* A, B, C, D et E en présence (+) et en absence (-) d'acide malique dans le milieu de fermentation, en condition d'anaérobiose et de micro-aérobie.

Condition	Souche		Acide citrique* consommé (g.L ⁻¹)	
Anaérobiose	A	+	1,15	
		-	1,15	
	B	+	0,36	
		-	0,23	
	C	+	0,44	
		-	0,17	
	D	+	0,07	
		-	0,36	
	E	+	0,27	
		-	0,32	
	Micro-aérobie	D	+	0,14
			-	0,19
E		+	0,34	
		-	0,11	

*Acide citrique consommé au cours de la durée correspondant à la durée de la FML.

L'étude réalisée par Saguir et Manca de Nadra (1997), dans du milieu MRS supplémenté de 15% de jus de tomate, a montré que pour une souche de *Leuconostoc oenos* la croissance était meilleure en présence de 2,5 g.L⁻¹ d'acide malique et 0,7 g.L⁻¹ d'acide citrique qu'en milieu non supplémenté en acide L-malique. Cependant, le gain en biomasse dans le premier cas a été uniquement multiplié par 1,2 ; contrairement aux gains que nous avons obtenus avec les souches A, B, C, D et E où la biomasse est multipliée par 2. Ceci peut s'expliquer, d'une part, par le fait que ces auteurs ont réalisé leurs expériences dans des conditions de cultures moins stressantes (pH 4,8 et 30 °C) et donc probablement les conditions de culture affectent l'assimilation de l'acide citrique. D'autre part, l'ajout du jus de tomate dans le milieu MRS apporte éventuellement une certaine quantité d'acide citrique et d'acide malique qui par conséquent favorise la croissance dans le milieu non supplémenté d'acide L-malique pure.

1.5. Conclusion

Les résultats des cultures de cinq souches d'*Æ. œni* dans le milieu MRS modifié ont montré que leurs profils de croissance sont différents et que leur sensibilité aux conditions d'anaérobiose ou de micro-aérobiose varie. Il existe donc une grande variabilité chez cette espèce. L'étude de la consommation d'acide L-malique montre qu'il n'y a pas de lien direct entre les biomasses obtenues, les productivités et la consommation d'acide L-malique mais il existe une forte corrélation entre les profils au cours du temps de la vitesse spécifique de croissance (μ) et de la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique (v). Le modèle mathématique proposé a permis de quantifier ce lien pour chaque souche. La-encore les constantes du modèle sont différentes selon les souches. Cependant, le modèle mathématique a été écrit en supposant que les bactéries consomment l'acide L-malique parce qu'elles croissent. Expérimentalement, il s'est révélé que ce processus se fait plutôt à l'inverse, c'est-à-dire que les bactéries croissent parce qu'elles consomment de l'acide L-malique. La réécriture du modèle sous une forme respectant le sens de la réalisation de ces phénomènes serait plus cohérent et constitue une perspective à cette étude.

Pour les cultures pures en condition anaérobie, nous avons également mesuré la consommation globale d'autres substrats qui se trouvent dans le milieu tels que l'acide citrique, le glucose et le fructose. Seul le fructose et l'acide citrique ont été partiellement consommés et pas glucose. En marge de l'évaluation de la croissance et de la consommation

d'acide L-malique, l'évaluation de la consommation d'acide citrique témoigne aussi de la variabilité intra-spécifique chez l'espèce *Enococcus oeni*.

Les expérimentations que nous avons réalisées pour évaluer l'effet de la consommation d'acide L-malique sur la croissance de chacune des 5 souches ont permis de mettre en évidence que :

- la présence d'acide L-malique bénéficie à la croissance des souches : selon la souche, un gain de productivité en biomasse allant de 1,7 à 2,7 a été obtenu en présence d'acide L-malique quelles que soient les conditions,
- l'absence de l'acide L-malique n'aboutit pas forcément à une consommation supplémentaire d'acide citrique. Au contraire, une diminution de la quantité d'acide citrique assimilée a été observé chez les souches B et C et chez la souche E en conditions de micro-aérobie. Il n'est jamais totalement consommé du milieu de culture, que ce soit en présence d'acide L-malique ou en son absence.

D'un point de vue pratique, la concentration d'acide L-malique dans le moût de raisin s'avère être un critère important pour assurer le bon déroulement de la FML.

Par la suite, dans le but d'étudier les interactions entre ces souches, les cultures mixtes des couples de bactéries seront réalisées en présence de la même quantité d'acide L-malique (4 g.L⁻¹). Cela permettra d'assurer les mêmes conditions de cultures en culture mixte comme en culture pures.

2. Évaluation des cultures mixtes

Les cultures mixtes ont été réalisées en conditions d'anaérobiose. Ce choix est fait pour être dans des conditions de cultures proches à celles de la fermentation malo-lactique du vin pendant laquelle le milieu ne contient pas d'oxygène dissous. Les 5 souches ont été croisées entre elles dans ces conditions. Les comportements des 10 couples A/B, A/C, A/D, A/E, B/C, B/D, B/E, C/D, C/E et E/D en cultures mixtes ont été alors étudiés.

Dans ce chapitre, la démarche d'évaluation des interactions entre 2 souches de bactéries sera d'abord présentée. Ensuite, nous exposerons les différents types d'interactions mis en évidence entre les couples des différentes souches.

2.1. Démarche d'évaluation des interactions

Les cultures mixtes de 6 couples parmi les 10 étudiés ont été répétées. Trois fois pour chacun des couples A/C, A/D et B/D et deux fois pour les couples A/B, E/C et D/C.

Toutes les cultures mixtes sont réalisées dans le BRM. Celui-ci permet de suivre séparément la croissance de chacune des souches qui demeurent dans le même milieu de culture (cf. § 2.1.2.2 du chapitre II). Il est alors possible de comparer le développement de chacune des souches en culture pure et en culture mixte avec une autre souche. En ce qui concerne la consommation d'acide L-malique (FML), il n'est pas possible de manière expérimentale de mesurer la quantité d'acide L-malique consommée par chacune des souches en culture mixte, dans le même milieu, alors que cette activité bactérienne est cruciale et que le vinificateur souhaite la maîtriser. La FML en cultures mixtes est donc évaluée seulement globalement.

Au cours des cultures mixtes, la détermination de la concentration en acide L-malique dans les 2 pots du BRM a été réalisée. Des concentrations similaires de part et d'autre de la membrane à fibre creuse témoignent de l'homogénéité des solutés du milieu de culture dans les 2 pots du BRM. La validité du BRM a été aussi vérifiée pour l'étude des interactions sans contact direct entre 2 micro-organismes. Dans l'objectif d'étudier si les interactions sont uniquement dues à l'évolution de la composition du milieu de la FML (épuisement et/ou libération de molécules), des cultures mixtes avec contact direct entre les deux souches d'un couple de bactéries ont été réalisées. Les couples A/C, A/D et D/C ont été testés. Ces cultures

mixtes ont été effectuées dans les mêmes conditions et dans le BRM mais en enlevant la membrane de séparation. Les résultats ont montré que le contact direct ne change pas la consommation globale d'acide L-malique par rapport aux cultures réalisées sans le contact direct entre les cellules. Nous en déduisons que les effets d'interactions mis en évidence par la suite ne seront pas du type interactions par contact direct entre deux souches différentes de cette espèce.

L'inoculation des cultures a été effectuée de façon à ce que la concentration initiale soit de 2×10^6 CFU.mL⁻¹ en culture pure et 1×10^6 CFU.mL⁻¹ pour chaque souche d'un couple de bactérie en culture mixte. De cette manière, la consommation globale de 2 souches cultivées ensemble en culture mixte est comparée avec la consommation de chacune des 2 souches en culture pure pour une même biomasse totale initiale. En effet on s'attend à avoir un effet additif de la consommation d'acide L-malique de chaque souche.

Nous avons tenté d'utiliser les critères de productivités (P et P_g), de la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) et de la durée de la phase de la latence pour comparer les croissances en culture pure et en culture mixte. La comparaison de ces critères pour une souche donnée ne permet pas de conclure à propos de l'effet de l'interaction sur le développement d'une souche. En effet, il n'existe pas de lien direct entre ces paramètres (cf. § 1.5 de ce chapitre) et les inoculations étant différentes ils s'avèrent difficiles à comparer. Pour cette même raison, la comparaison directe des profils de croissance de chacune des souches d'un couple en culture mixte et en culture pure ne permet pas toujours de conclure sur une interaction ou pas entre 2 souches de bactéries. Dans la démarche, nous associerons la comparaison de ces croissances (en pur et en mixte) à la comparaison des vitesses spécifiques de croissance. En effet, s'il n'y a pas d'interaction entre deux souches données au cours de leur culture mixte, les cellules de chaque souche devraient conserver la même activité spécifique de croissance en culture mixte comme en culture pure. La comparaison des profils de μ en culture pure et en culture mixte a donc été effectuée et sera associée à la comparaison des courbes de croissance pour trancher sur les interactions.

Le modèle que nous avons proposé et validé (cf. § 1.3.1 du chapitre III) pour représenter l'activité spécifique de croissance (μ) en fonction de l'activité de consommation d'acide L-malique (v) avait permis de quantifier le lien entre ces activités pour chacune des

souches. Ce modèle va nous servir maintenant pour évaluer la consommation globale d'acide L-malique que 2 souches de bactéries *Æ. œni* peuvent réaliser ensemble en cultures mixtes.

Dans l'objectif de vérifier si, en culture mixte, le lien de proportionnalité (constantes k , k_{mal}) entre l'activité spécifique de croissance et l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique est le même qu'en culture pure, nous avons procédé à la modélisation de la consommation d'acide L-malique en culture mixte. En disposant des constantes k et k_{mal} pour chacune des souches en cultures pures, la consommation d'acide L-malique est alors calculée en utilisant les données expérimentales des concentrations en biomasses de chacune de 2 souches en culture mixte selon l'équation suivante :

$$\frac{d[mal]}{dt} = X_{s1,mixte} \times k_1 \times \mu_1 \times \frac{[mal]}{[mal] + k_{mal1}} + X_{s2,mixte} \times k_2 \times \mu_2 \times \frac{[mal]}{[mal] + k_{mal2}}$$

Cette consommation modélisée en culture mixte pour un couple de bactérie est ensuite comparée à sa consommation expérimentale.

En résumé, pour chaque couple, après avoir réalisé les cultures pures de ses 2 souches et sa culture mixte, d'abord, les croissances de 2 souches en cultures pures sont comparées à leurs croissances en culture mixte. Ensuite, la consommation globale d'acide L-malique en culture mixte est comparée à la consommation de chacune des souches en culture pure. Et enfin, la consommation globale expérimentale d'acide L-malique est également comparée à la consommation d'acide L-malique modélisée en mixte pour vérifier s'il y a un effet d'interaction ou pas sur le lien global de proportionnalité entre l'activité spécifique de croissance (μ) et l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique (v). S'il y a une interaction, cette analyse permet de distinguer le(s) type(s) d'effet(s) d'interaction qui existe entre 2 souches de bactéries.

2.2. Interactions mises en évidence

La réalisation des cultures mixtes des 10 couples des croisements des 5 souches d'*Æ. œni* et l'effet observé sur la croissance a permis de classer les couples en 3 catégories d'interactions :

- interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte;
- interactions à effets négatifs sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effets positifs sur la croissance de la souche la plus lente en culture pure.
- interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure.

Vu la variabilité des souches (cf. § 1.5 de ce chapitre), les niveaux d'effets d'interaction sur la croissance et sur la consommation d'acide L-malique sont différents d'un couple à l'autre dans une même catégorie. Pour cela, dans les paragraphes qui suivent nous analyserons l'ensemble des 10 cultures mixtes, puis nous exposerons un récapitulatif de ces cultures au paragraphe 2.2.4.

2.2.1. Interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte

2.2.1.1. Couple A/B

Les croissances de chacune des souches du couple A/B en culture mixte sont nettement plus faibles par rapport à leur croissance en cultures pures (Figure III.12).

Les calculs des vitesses spécifiques de croissances μ (Figure III.13) montrent que cette vitesse μ est nulle pour la souche A durant les premières 105 h de la culture mixte. Elle reste ensuite plus faible que sa vitesse μ en culture pure jusqu'à environ 170 h de culture. Bien que la vitesse μ de cette souche A s'accélère alors et atteint un μ_{\max} environ 2 fois plus élevée en culture mixte qu'en culture pure, elle ne permet pas d'atteindre au final les mêmes biomasses que celles obtenues lors de sa culture pure (Figure III.13). Un effet négatif a été donc exercé sur la croissance de la souche A au début de sa culture et un effet positif a été obtenu après 170 h en culture mixte avec la souche B. La vitesse μ de la souche B est plus faible tout au long de sa culture mixte par rapport à sa vitesse en culture pure. Au cours de la culture mixte A/B la souche B est plus affectée que la souche A. En effet, ces 2 souches possèdent des vitesses similaires en cultures pures, alors qu'en culture mixte les vitesses atteintes par la souche A sont beaucoup plus élevées que les vitesses μ atteintes par la souche B.

Par conséquent, entre ces deux souches, il s'agit d'une interaction à effet négatif réciproque sur la croissance des 2 souches au cours des premières 170 h en culture mixte, ensuite un effet positif est exercé sur l'activité de la souche A pour le reste de la culture.

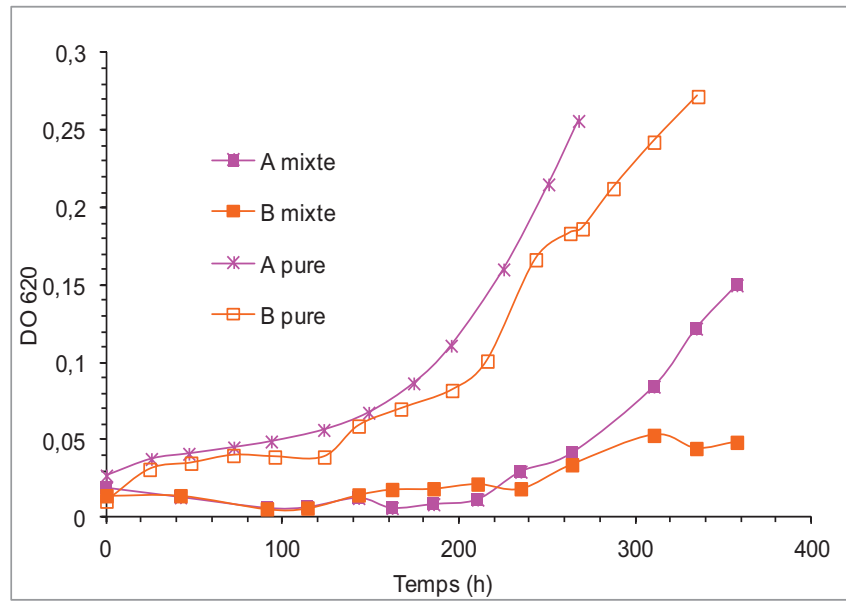


Figure III. 12. Croissances des souches d'*C. œni* A et B en cultures pures et en culture mixte.

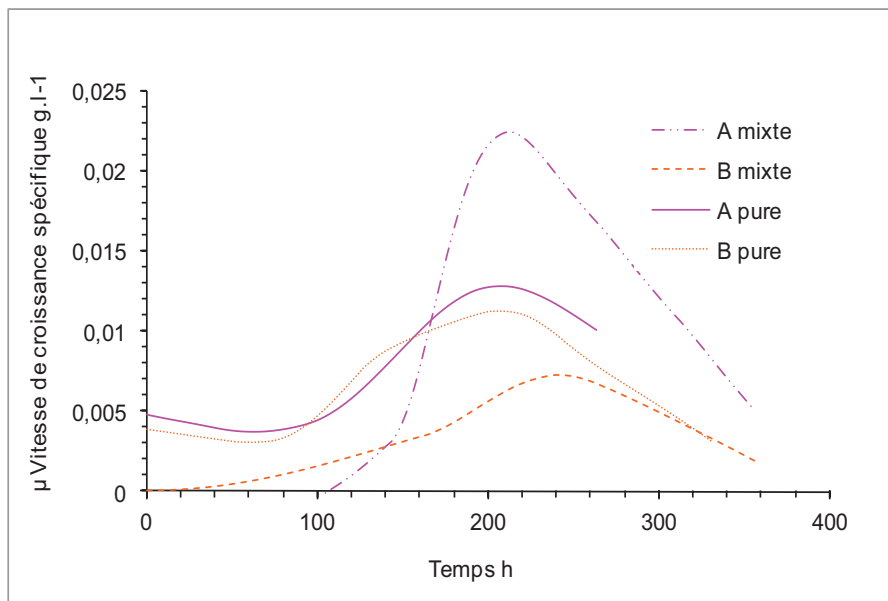


Figure III. 13. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*C. œni* A et B en cultures pures et en culture mixte.

Globalement, la FML en culture mixte est plus lente que la FML obtenue en culture pure pour chacune des souches.

Pour ces souches A et B, le profil de la consommation d'acide L-malique modélisée en culture mixte et le profil de la consommation expérimentale sont presque identiques au cours

de la consommation de la moitié de la quantité d'acide L-malique initialement présente dans le milieu (Figure III.14). On en déduit que, au cours de cette phase, le lien global entre les activités spécifiques de croissance et de consommation d'acide L-malique (μ et v) est identique en culture pure et en culture mixte. Les souches A et B semblent donc avoir ici chacune les mêmes constantes déterminées au chapitre précédent (k_i et K_{mal}).

En fin de culture, après environ 280 h de culture, l'écart entre la consommation modélisée et la consommation expérimentale devient supérieur à 14 % (intervalle de confiance accordé aux concentrations en acide malique qui a été déterminé au chapitre précédent). le lien entre μ et v ne peut donc plus être considéré comme identique en culture pure et mixte. Un effet positif sur ce lien semble être obtenu au cours de cette phase en culture mixte.

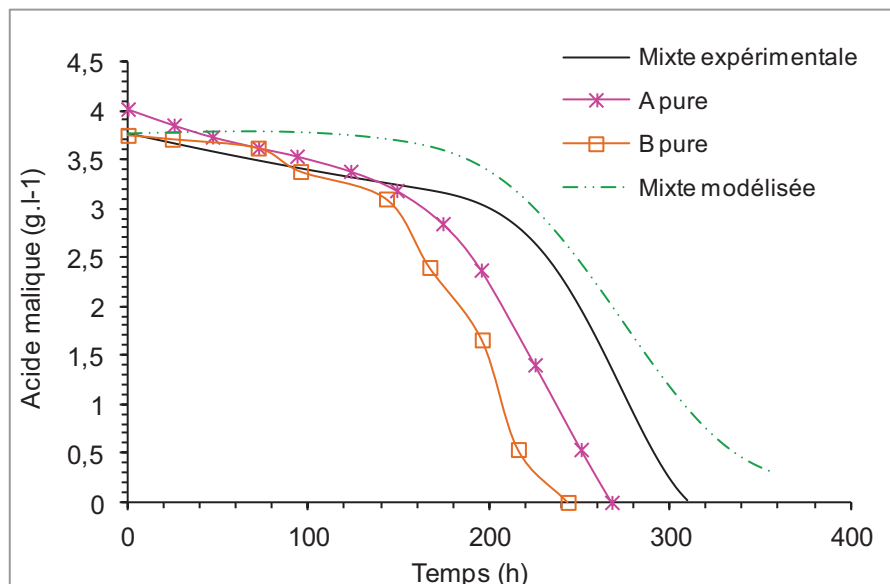


Figure III. 14. Consommation d'acide L-malique des souches A et B en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.2. Couple A/C

Pour ce couple A/C, tout au long de la culture mixte, les biomasses obtenues sont plus faibles que celles obtenues dans le cas de chacune des 2 souches en cultures pures (Figure III.15). La souche C ne se développe pas en culture mixte bien que les 2 souches aient des profils de croissances assez proche en cultures pures. L'interaction existant peut être du-type

inhibition par production de métabolite(s) extracellulaire(s) qui inhibe fortement la croissance de la souche C et inhibe moins la souche A.

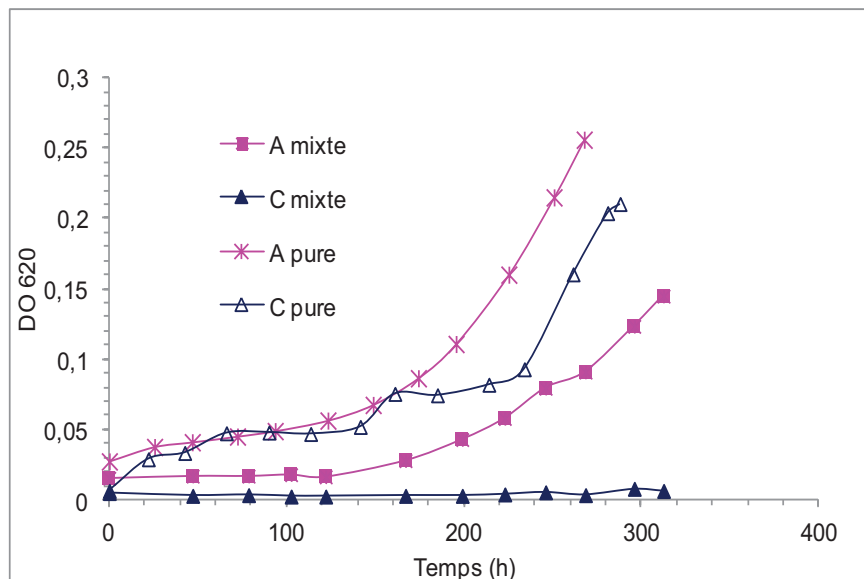


Figure III. 15. Croissances des souches d'*E. coli* A et C en cultures pures et en culture mixte.

En observant les vitesses spécifiques μ , on constate que celle de la souche A en début de culture mixte est très faible par rapport à celle en culture pure (Figure III.16). Elle diminue les premières 60 h avant de s'accélérer à nouveau pour atteindre des vitesses relativement similaires à celles obtenues en culture pure. La vitesse spécifique μ de la souche C est nulle durant 120 h de culture, ensuite elle augmente pour atteindre un μ_{\max} 2 fois plus faible que son μ_{\max} en culture pure. On en conclut donc que la souche C est affectée tout au long de sa culture mixte tandis que pour la souche A l'interaction négative a lieu uniquement durant les 120 premières heures.

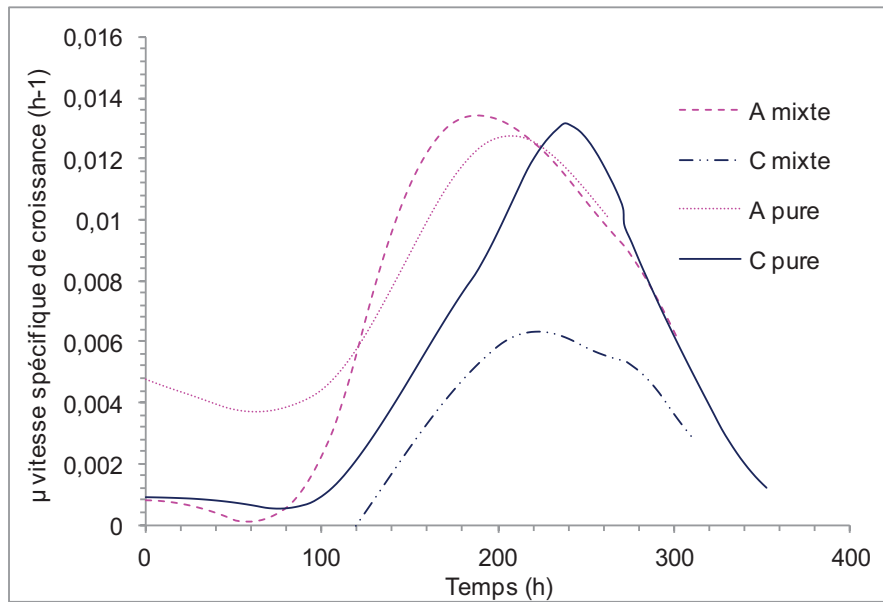


Figure III. 16. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*Æ. œni* A et C en cultures pures et en culture mixte.

Nous pouvons constater que la consommation globale d'acide L-malique par les souches A et C en culture mixte a un profil comparable à celui des 2 pures (Figure III.17). La FML se termine cependant 29 h plus tard que la consommation de la souche A en culture pure. L'effet de l'interaction sur la consommation globale d'acide L-malique par les 2 souches en culture mixte est donc négatif puisque cette consommation est plus tardive que la consommation de la souche A, la seule à se développer en mixte.

Si on compare les profils de la consommation expérimentale et la consommation modélisée en culture mixte, ils ne sont pas superposables (Figure III.17). Ceci signifie que le lien global entre les vitesses v et μ en cultures pures n'est pas conservé en culture mixte, et vu que les croissances des souches (A et C) sont affectées à des degrés différents, il est probable que le lien entre les vitesses v et μ de chaque souche ou de l'une des 2 souches en culture mixte est aussi affecté. La consommation expérimentale s'achèvant plus tôt que la consommation modélisée, il existe donc un effet d'interaction positif sur le lien global en culture mixte.

En culture mixte de ce couple A/C, il y a une inhibition de la croissance des souches et une activation de la consommation d'acide L-malique. On peut interpréter ce phénomène comme une augmentation de la capacité des cellules à consommer l'acide L-malique. Il est également

possible que pour une même consommation d'acide L-malique la croissance soit moindre. Par conséquent le lien global entre les vitesses v et μ est affecté positivement en culture mixte.

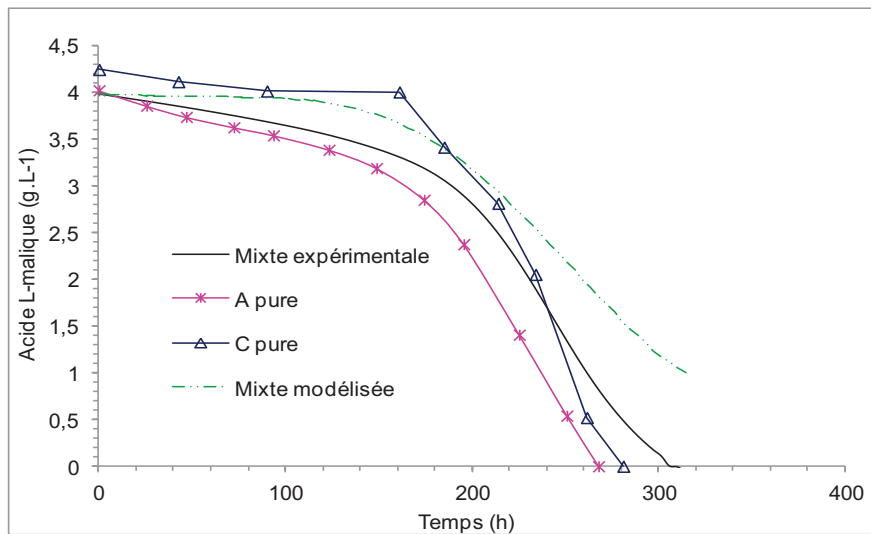


Figure III. 17. Consommation d'acide L-malique des souches A et C en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.3. Couple A/D

Les souches A et surtout D se développent moins bien en culture mixte qu'en culture pure (Figure III.18) comme le montre également leurs profils de vitesses spécifiques de croissance sur la figure III.19. La vitesse μ de la souche D n'augmente jamais et devient nulle après 180 h de sa culture mixte. Cette souche est plus affectée que la souche A où la différence des profils de μ est plus faible entre culture pure et culture mixte

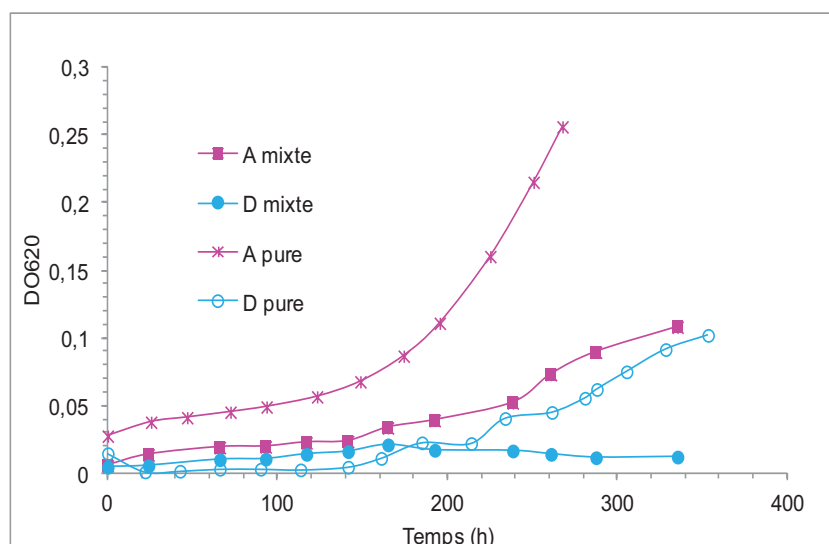


Figure III. 18. Croissances des souches d'*CE. æni* A et D en cultures pures et en culture mixte.

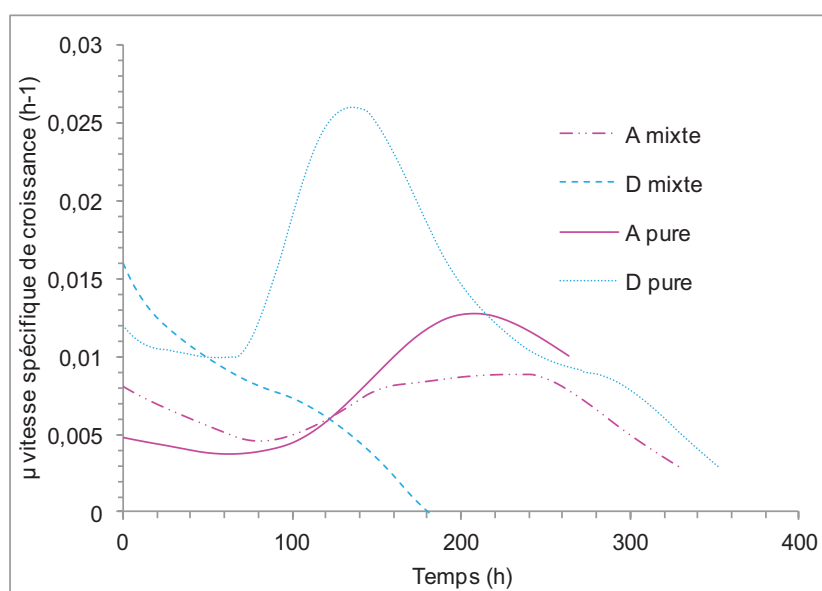


Figure III. 19. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*CE. æni* A et D en cultures pures et en culture mixte.

Malgré une croissance différente en culture pure les 2 souches avaient des profils de consommation d'acide L-malique similaires. En culture mixte on retrouve ce même profil bien qu'il n'y ait que la souche A qui se développe. À partir du moment où la croissance de la souche A prend le dessus sur la croissance de la souche D (Figure III.20), la consommation d'acide L-malique modélisée devient plus lente par rapport à la consommation expérimentale

en culture mixte. On en déduit qu'un effet global positif est exercé sur le lien entre les activités spécifiques μ et v .

Le comportement de ce couple A/D en ce qui concerne la consommation d'acide L-malique reste difficile à expliquer.

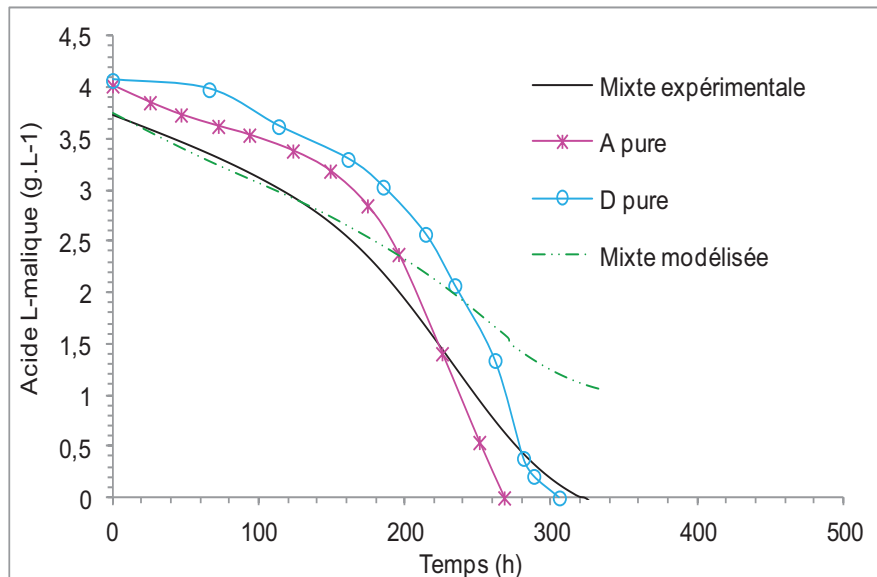


Figure III. 20. Consommation d'acide L-malique des souches A et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.4. Couple B/C

Les croissances des deux souches sont affectées en culture mixte, surtout en ce qui concerne leur phase de latence (Figure III.21). Leurs profils de vitesse spécifique de croissance montrent également que leur activité est affectée négativement au cours de 290 h environ en culture mixte, ensuite elles atteignent des vitesses spécifiques maximales μ_{\max} plus élevées en culture mixte qu'en cultures pures mais après environ 360 h de culture (Figure III.22).

Leur consommation d'acide L-malique en culture mixte est très lente par rapport aux cultures pures. Et il n'y a pas d'effet sur le lien global entre les activités v et μ du fait que la consommation expérimentale par les deux souches en culture mixte est identique à la consommation modélisée.

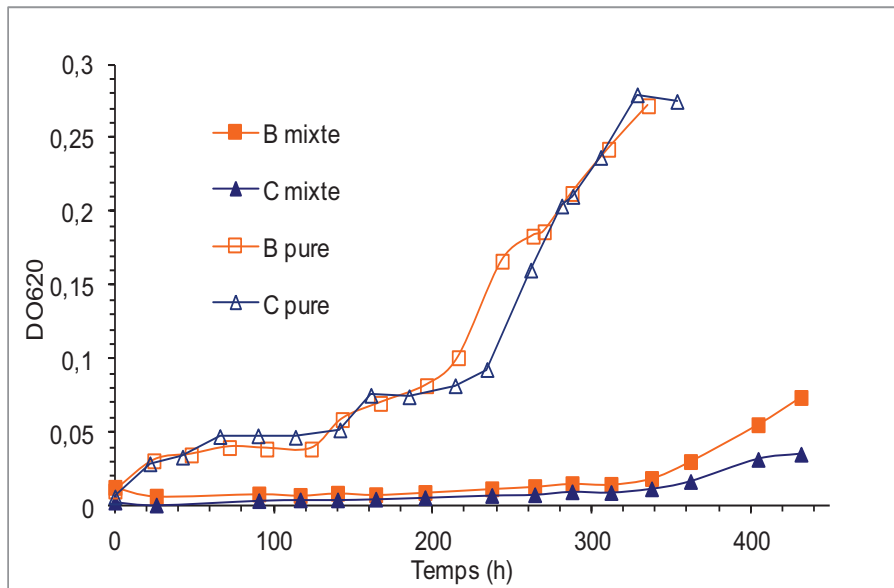


Figure III. 21. Croissances des souches d'*Œ. æni* B et C en cultures pures et en culture mixte.

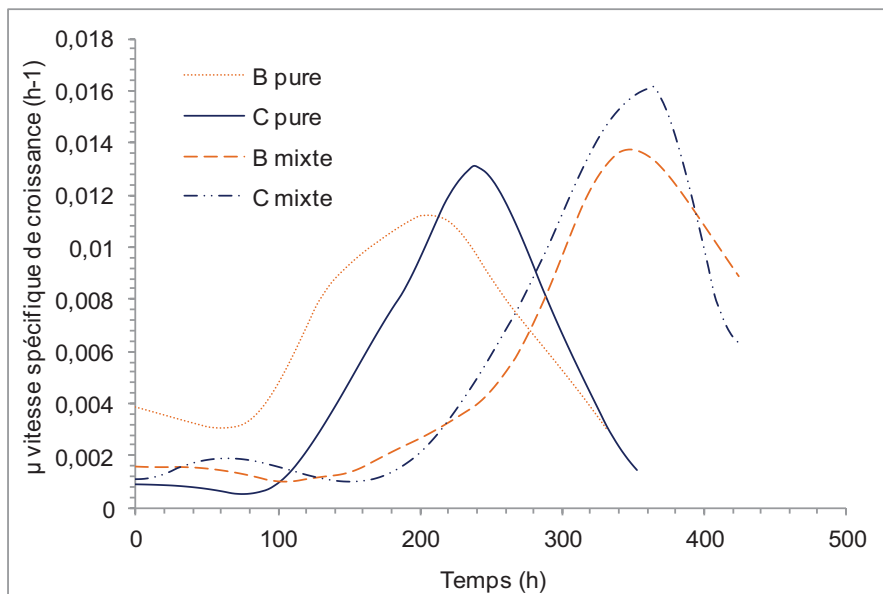


Figure III. 22. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*Œ. æni* B et C en cultures pures et en culture mixte.

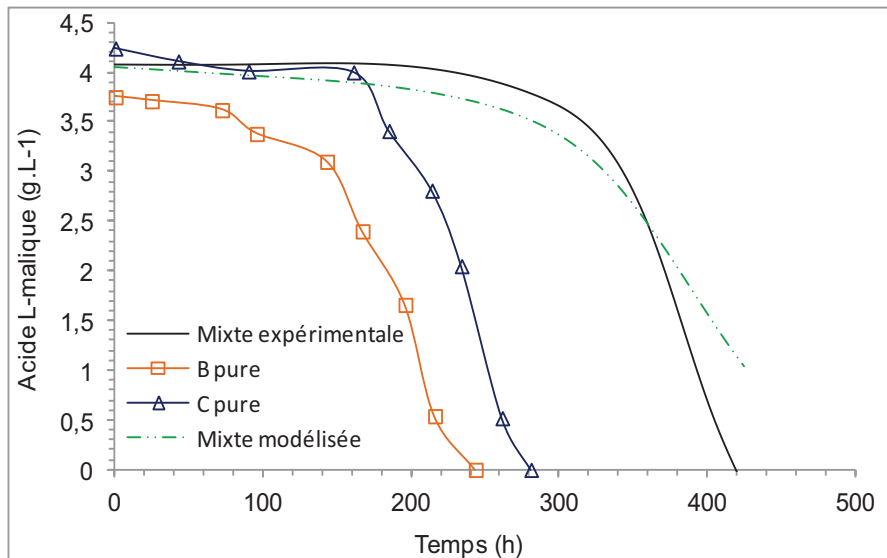


Figure III. 23. Consommation d'acide L-malique des souches B et C en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.5. Couple B/D

Pour ce couple, les biomasses obtenues en culture mixte (Figure III.24) sont faibles par rapport aux cultures pures comme pour les couples précédents (A/B, A/C, A/D et B/C). Les allures de la vitesse spécifique de croissance sont également affectées (Figure III.25). La souche D présente de faibles vitesses μ au cours de la culture mixte par rapport à celles obtenues au cours de sa culture pure. La vitesse spécifique μ de la souche B reste nulle après l'inoculation en culture mixte durant 110 h environ ; elle augmente ensuite fortement. Malgré ceci, la biomasse obtenue en culture mixte de la souche B est très faible en comparaison avec celle obtenue pour sa culture pure. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en culture mixte, durant la première phase où la vitesse μ est nulle, il y ait une perte cellulaire et ne persiste dans le milieu qu'une faible quantité de cellules qui deviennent plus résistantes et plus actives par la suite.

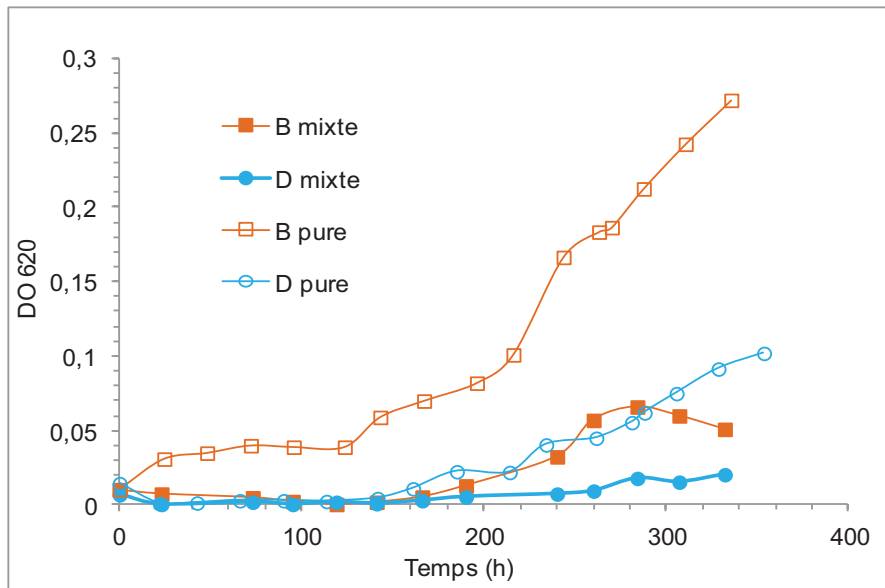


Figure III. 24. Croissances des souches d'Æ. œni B et D en cultures pures et en culture mixte.

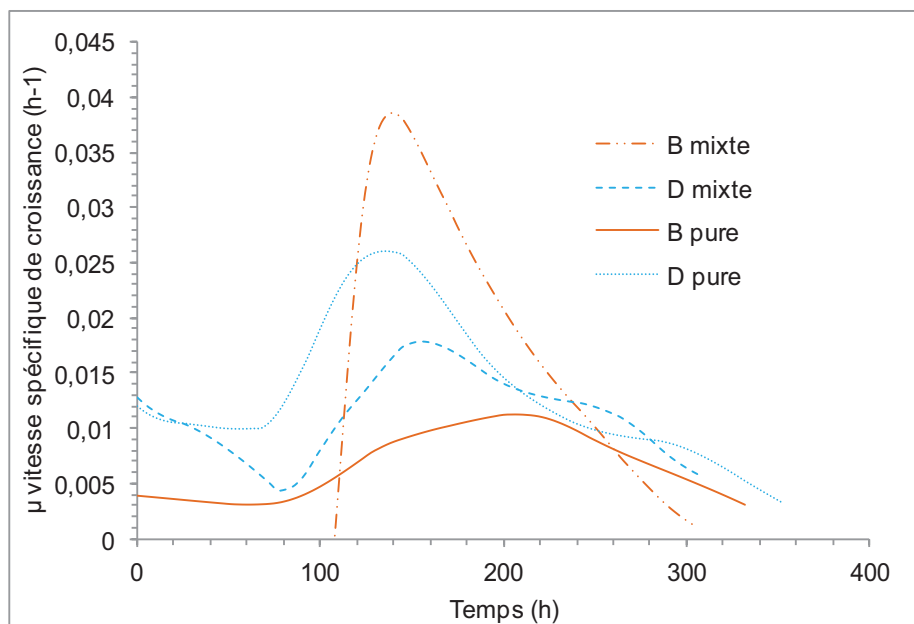


Figure III. 25. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'Æ. œni B et D en cultures pures et en culture mixte.

La consommation globale d'acide L-malique par les 2 souches B et D en culture mixte est plus lente que celle des cultures pures (Figure III.26).

Le profil modélisé de la consommation d'acide L-malique en culture mixte est similaire à la consommation expérimentale jusqu'à environ 290 h de culture, après avoir consommé la moitié d'acide L-malique initialement présent dans le milieu, puis diverge sur la fin. Au cours de ces dernières heures, la consommation expérimentale est plus rapide que la consommation modélisée. Un effet positif sur le lien global entre les activités spécifiques μ et v est donc obtenu durant la dernière phase de la FML en culture mixte.

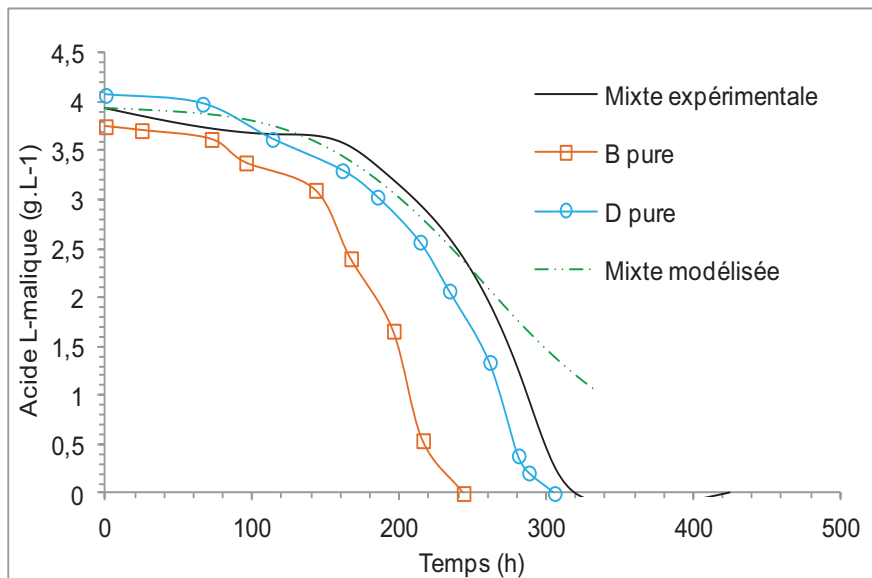


Figure III. 26. Consommation d'acide L-malique des souches B et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.6. Couple D/C

Pour ce couple la croissance de chacune des 2 souches en culture mixte est inférieure à la croissance en culture pure (Figure III.27) et reste très faible. L'effet de l'interaction entre ces 2 souches est remarquable sur leur vitesse spécifique de croissance (Figure III.28) : elles sont nulles au cours des premières 170 h pour chacune des souches en culture mixte. Il s'agit d'une interaction à effet négatif réciproque sur le développement de chacune des 2 souches en culture mixte.

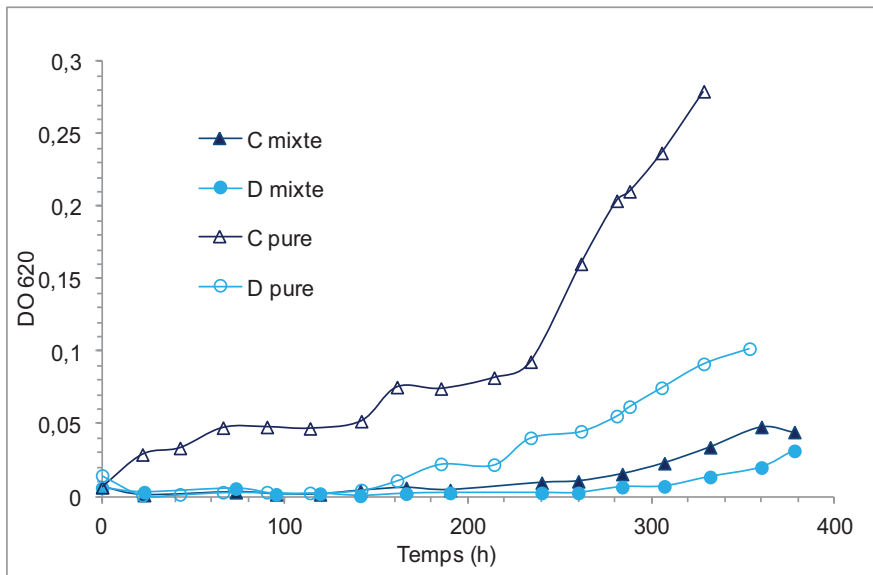


Figure III. 27. Croissances des souches d'*Æ. œni* C et D en cultures pures et en culture mixte.

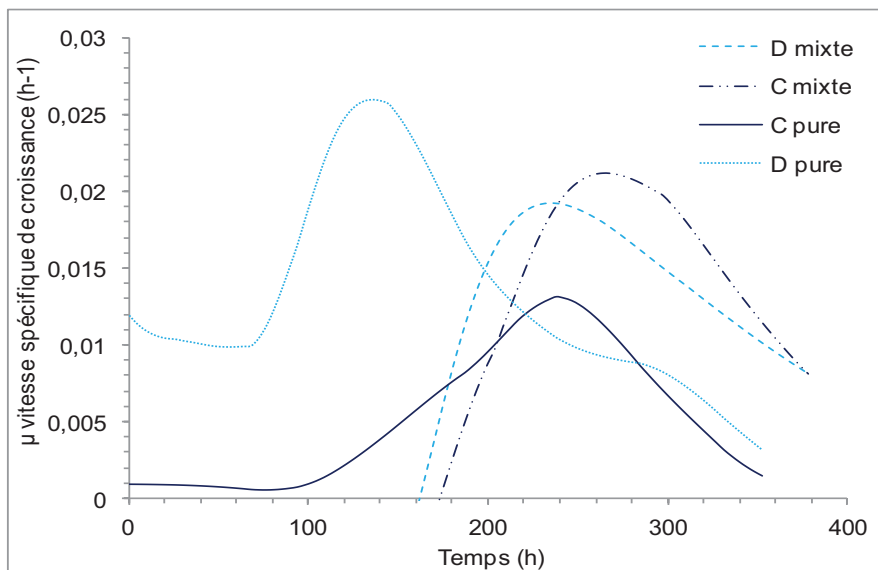


Figure III. 28. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*Æ. œni* D et C en cultures pures et en culture mixte.

Concernant la consommation d'acide L-malique par les souches D et C. Leur consommation en culture mixte se termine bien plus tard par rapport à la consommation de chacune des 2 souches en culture pure (Figure III.29). Le lien global entre les vitesses spécifiques v et μ en culture mixte est nettement affecté. En effet, la consommation modélisée est plus lente que la consommation expérimentale observée en culture mixte. Cela signifie

qu'il y a un effet positif sur le lien global entre les vitesses v et μ en culture mixte. Le retard de la consommation expérimentale observé est en effet dû à la faible croissance des souches en culture mixte. Cela implique que l'activité de dégradation malo-lactique est plus élevée que celle qu'on aurait pu attendre compte tenu de la croissance des souches.

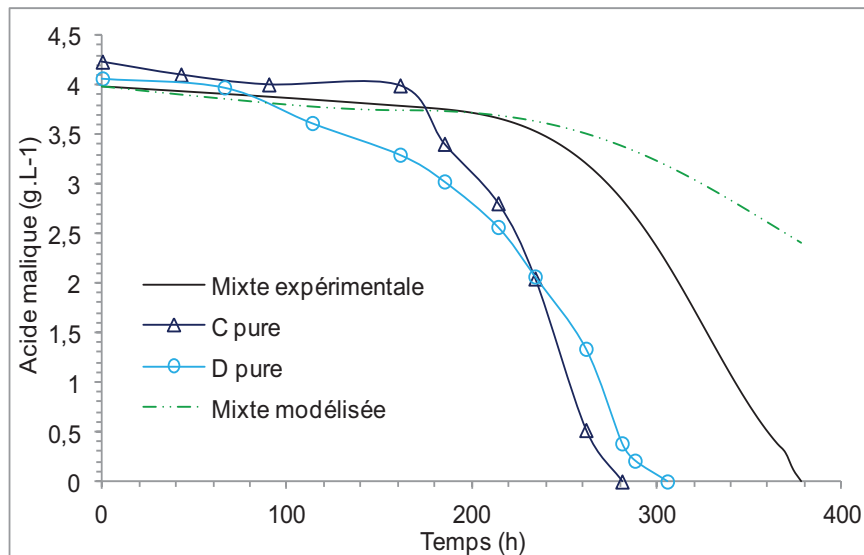


Figure III. 29. Consommation d'acide L-malique des souches C et D en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.1.7. Conclusion

Globalement, l'étude des couples A/B, A/C, A/D, B/C, B/D et D/C a mis en évidence des interactions à effet négatif sur le développement de ces souches en culture mixte par rapport à leur développement en cultures pures. Ceci se traduit par une inhibition de la croissance des 2 souches mais le niveau d'inhibition est différent d'un couple à l'autre, mais aussi d'une souche à l'autre au sein d'un même couple. De même, la FML de ces couples est plus ou moins ralentie en culture mixte en comparaison avec la FML en culture pure de chacune des 2 souches. Cependant, la FML des couples A/B, B/C et D/C est beaucoup plus affectée que la FML des couples A/C, A/D et B/D. La modélisation a également montré qu'il existe des interactions sur le lien entre la consommation d'acide L-malique et la quantité de biomasse produite dans le cas des couples A/C, A/D, B/D et D/C. Pour ces couples, malgré une bonne consommation d'acide L-malique, l'effet stimulant sur la croissance n'est pas quantitativement identique à celui observé en cultures pures.

2.2.2. Interactions à effets négatifs sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effets positifs sur la croissance de la souche la plus lente.

Ce type d'interaction concerne 3 couples où la souche affectée positivement en culture mixte est toujours la E.

2.2.2.1. Couple B/E

Nous constatons que les profils de croissance des 2 souches B et E en cultures pures sont inversés en culture mixte (Figure III.30). Par conséquent, pour ce couple B/E il existe une interaction qui induit une activation de la souche E et une remarquable inhibition de la souche B. Les profils des vitesses spécifiques de croissance μ montrent également les effets de cette interaction (Figure III.31). La durée de la phase de la latence de la souche B est plus longue en culture mixte qu'en culture pure. Concernant la souche E qui est activée en culture mixte, sa vitesse spécifique μ augmente 120 h plus tôt que son augmentation en culture pure. Bien que son μ_{\max} en culture pure soit 1,7 fois plus élevée que son μ_{\max} en culture mixte, elle reste performante en termes de biomasse obtenue en culture mixte. La présence de la souche B active le développement de la souche E qui maintient une vitesse spécifique de croissance non nulle après l'inoculation contrairement à sa culture pure où cette vitesse μ est nulle les premières 155 h.

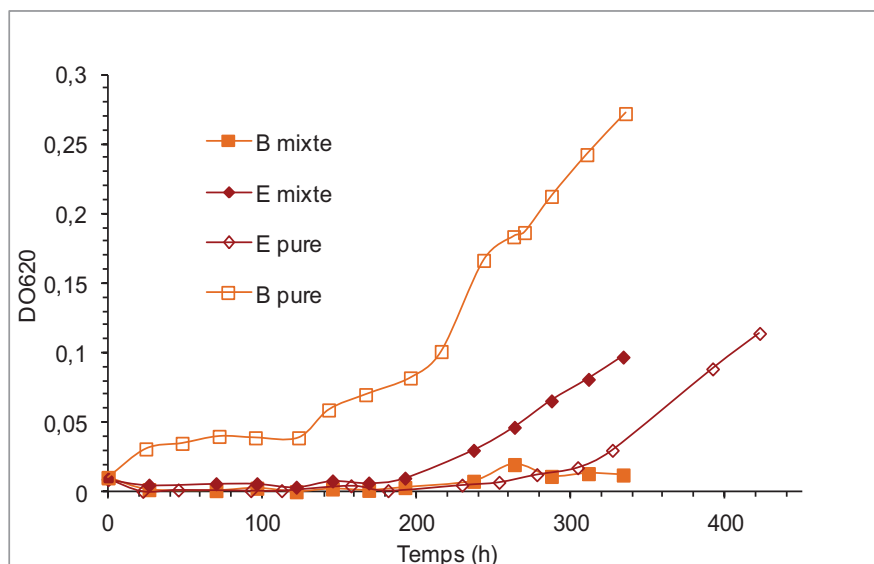


Figure III. 30. Croissances des souches d'*C. œni* B et E en cultures pures et en culture mixte.

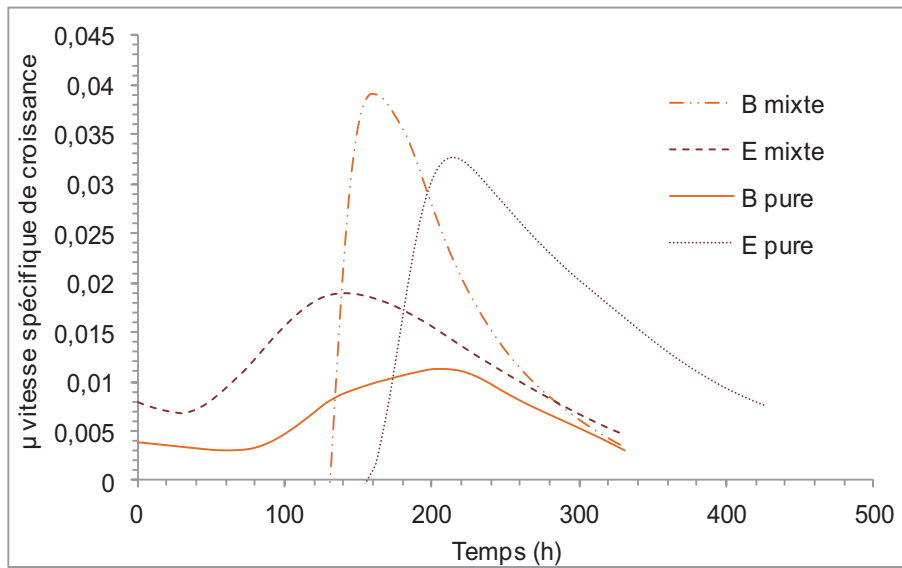


Figure III. 31. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*C. æni* B et E en cultures pures et en culture mixte.

La figure III.32 présente les résultats de la consommation d'acide L-malique par les souches B et E. La consommation expérimentale des 2 souches en culture mixte est beaucoup plus rapide que la consommation de la souche E en culture pure. La consommation modélisée pour la culture mixte est plus lente que la consommation expérimentale. Un effet global positif est donc exercé sur le lien entre les activités v et μ des deux souches B et E.

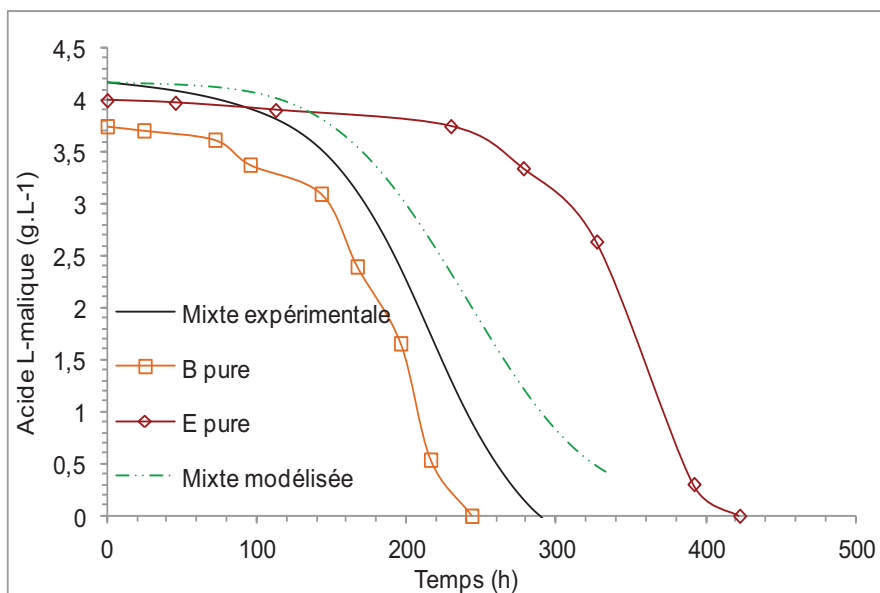


Figure III. 32. Consommation d'acide L-malique des souches B et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.2.2. Couple C/E

La croissance des souches C et E en culture mixte comparée à leurs croissances en cultures pures (Figure III.33) montre que la souche C ne se développe pas en culture mixte alors que la souche E se développe bien mieux, avec une réduction en la durée de la phase de la latence de 90 h (Figure III.34). En conséquence, une interaction à effet nettement positif sur la souche E et négatif sur la souche C est mise en évidence.

Les profils des vitesses spécifiques de croissance μ de la souche C montre également cette inhibition de sa croissance en culture mixte par rapport à sa culture pure. La vitesse spécifique μ de la souche E est activée en culture mixte parce qu'elle démarre après 70 h de culture tandis qu'en culture pure cette vitesse n'augmente qu'après 155 h de culture.

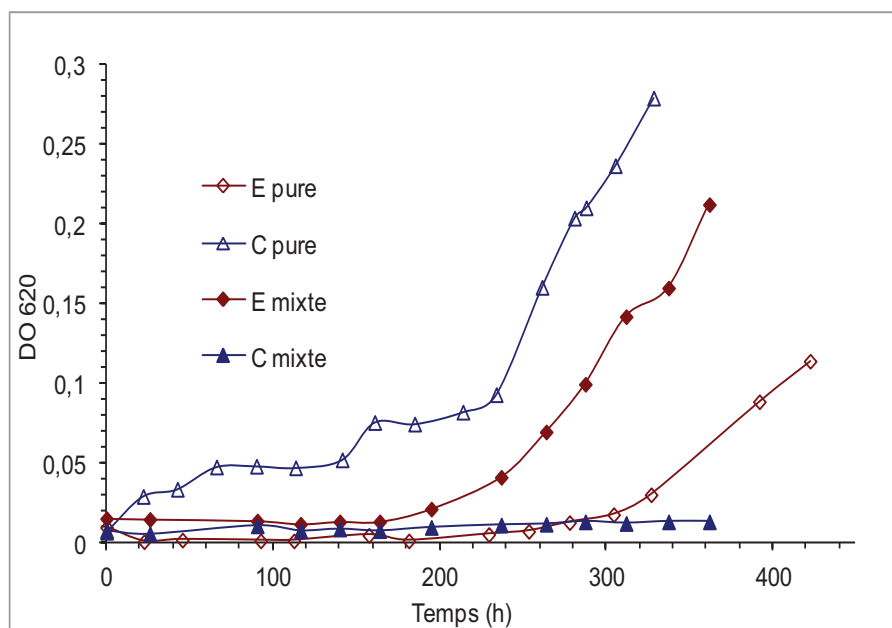


Figure III. 33. Croissances des souches d'œni C et E en cultures pures et en culture mixte.

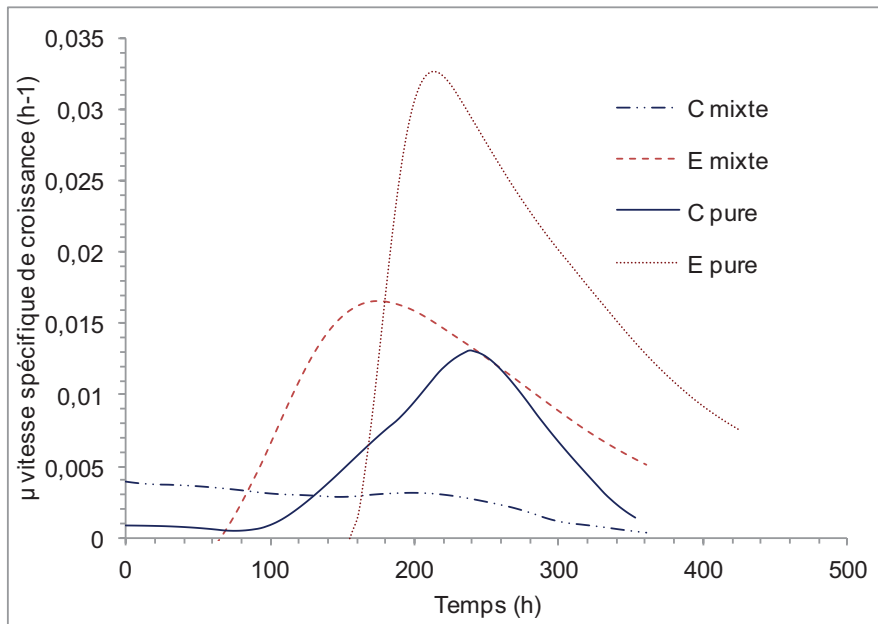


Figure III. 34. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*Æ. œni* C et E en cultures pures et en culture mixte.

Le profil de consommation d'acide L-malique par les deux souches E et C en culture mixte se trouve entre les profils de la consommation de chacune des souches en cultures pures (Figure III.35). La consommation de la souche E est donc activée puisque la souche C ne se développe pas en culture mixte à moins que C consomme sans se développer, ce qui est peu probable.

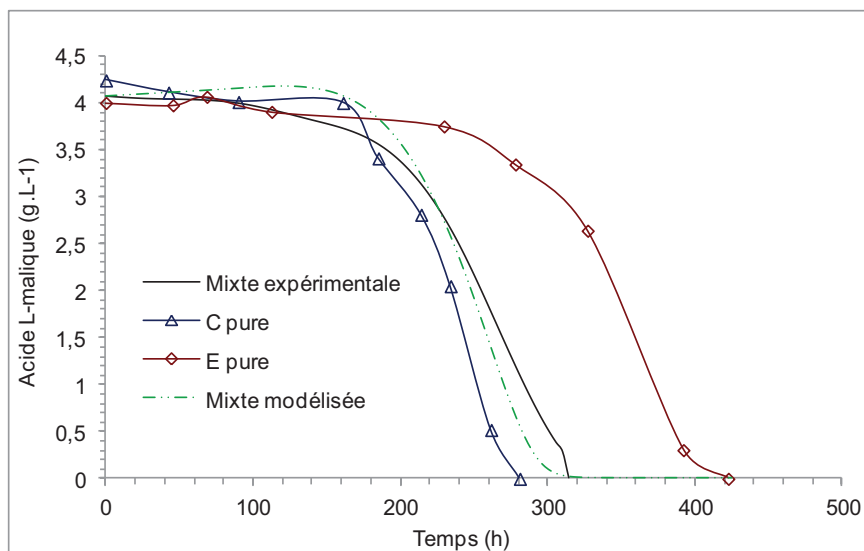


Figure III. 35. Consommation d'acide L-malique des souches C et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

Le lien global entre les activités v et μ semble ne pas être affecté, du fait que la consommation modélisée en mixte est superposable avec la consommation expérimentale.

2.2.2.3. Couple D/E

Comme pour les couples B/E et C/E, les souches D et E en culture mixte présentent des profils de croissance inversés par rapport à leurs profils en cultures pures (Figure III.36). La vitesse spécifique de croissance de la souche D est quasiment nulle durant 120 h en culture mixte puis n'augmente que faiblement. Comme pour les couples B/E et C/E, en culture mixte la vitesse spécifique de croissance de la souche E augmente plus rapidement qu'en début de sa culture pure (Figure III.37) ce qui lui permet d'atteindre des biomasses élevées bien que ses vitesses μ au cours de la FML n'atteignent pas celles obtenues au cours de sa culture pure. Il s'agit d'une interaction qui a abouti à une inhibition remarquable de la souche D et une activation de la souche E.

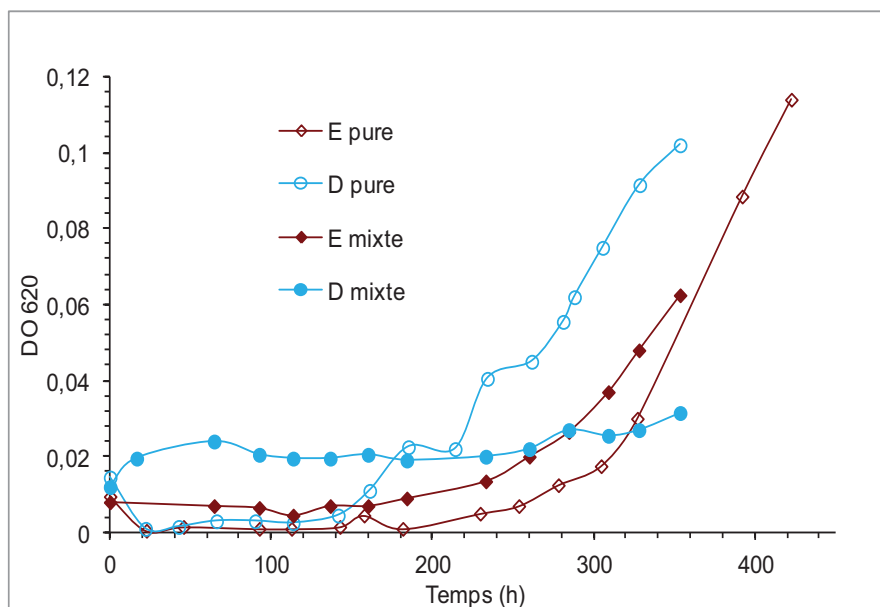


Figure III. 36. Croissances des souches d'œni D et E en cultures pures et en culture mixte.

La figure III.38 présente les consommations d'acide L-malique par les souche D et E. En comparant les profils des consommations en cultures pures avec la consommation expérimentale en culture mixte, il apparait que cette dernière est intermédiaire. Elle est d'environ 40 h plus lente que la consommation de la souche D mais environ 40h plus rapide

que la consommation de la souche E en culture pure. Il est alors probable que la présence de la souche E retarde la FML de la souche D en culture mixte et/ou que la présence de la souche D accélère la consommation d'acide L-malique par la souche E.

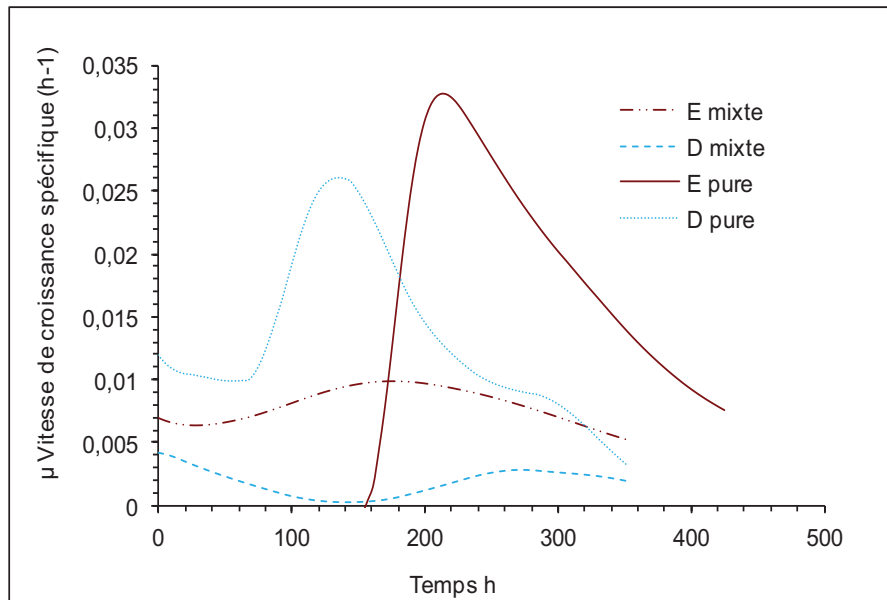


Figure III. 37. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*C. œni* D et E en cultures pures et en culture mixte.

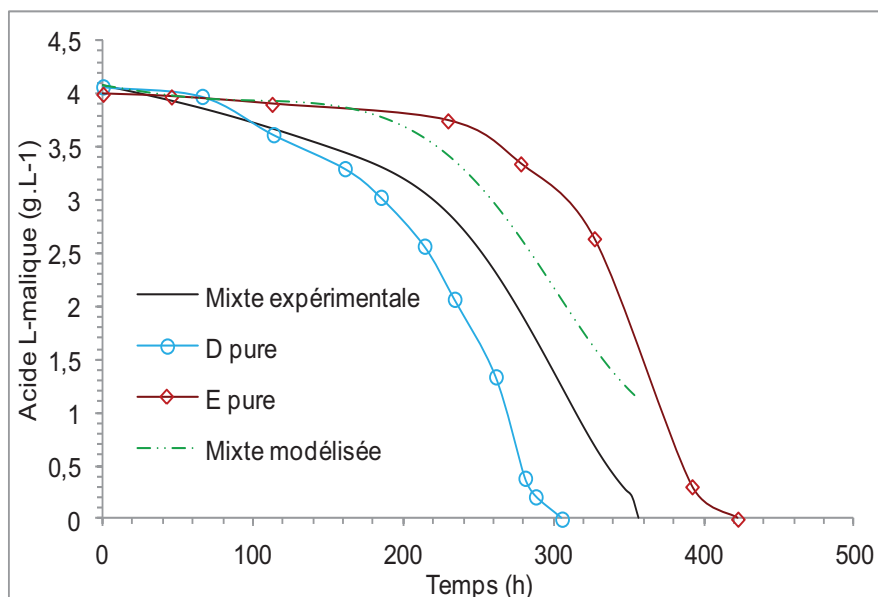


Figure III. 38. Consommation d'acide L-malique des souches D et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

De plus, la consommation expérimentale en culture mixte est plus rapide que la consommation modélisée. Ceci implique que le lien global entre l'activité spécifique de la consommation d'acide L-malique (v) et l'activité spécifique de croissance (μ) en culture mixte n'est pas le même qu'en cultures pures. Un effet global positif sur ce lien est alors obtenu en culture mixte.

2.2.2.4. Conclusion

En définitive, nous avons constaté que pour ces 3 couples B/E, C/E et D/E la souche E est toujours activée et atteint plus rapidement des biomasses plus élevées en culture mixte qu'en culture pure. En effet il semble que la présence d'une autre souche (B, C ou D) l'active, ce qui lui permet de maintenir une certaine vitesse spécifique de croissance après l'inoculation contrairement à sa culture pure. La longueur de la durée de la phase de la latence en culture pure est probablement due à la mortalité initiale et ne persistent dans le milieu de culture que les cellules les plus résistantes. En présence de la souche E, chacune des 3 autres souches B, C et D ont été fortement inhibées en culture mixte. Une interaction de type inhibition de la croissance de la souche la plus rapide et stimulation de la souche la plus lente a été donc retrouvée chez ces 3 couples de bactéries.

En général, la consommation d'acide L-malique en culture mixte pour chacun des couples B/E et C/E est presque similaire à la consommation de la souche la plus rapide en culture pure, respectivement, les souches B, C alors que cette consommation dans le cas du couple D/E est intermédiaire à la consommation des 2 souches en cultures pures.

Un effet positif sur le lien global de proportionnalité entre les vitesses v et μ a été constaté pour les couples B/E et D/E. Pour le couple C/E, les calculs de la consommation d'acide L-malique montrent qu'il n'y a pas d'effet sur le lien global de sa consommation en culture mixte.

2.2.3. Interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure

2.2.3.1. Couple A/E

En comparant les profils de croissance des 2 souches A et E en culture pure et en culture mixte (Figure III.39), on constate que la souche A se développe moins bien en culture mixte

durant les premières 120 h. Par la suite elle présente un profil de croissance similaire à son profil en culture pure. La souche E ne se développe pas tout au long de la culture de la FML en culture mixte.

Les effets d'interaction entre ces deux souches sont également remarquables sur leurs profils de vitesses spécifiques de croissance μ (Figure III.40). La vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) de la souche A en culture mixte est environ deux fois plus élevée que le μ_{\max} obtenu en culture pure. Alors qu'elle est inoculée deux fois moins en culture mixte qu'en culture pure, cette souche A atteint des biomasses similaires au cours de la phase de croissance. Il semble donc que la souche A est activée par la présence de la souche E en culture mixte. Pour la souche E la vitesse de croissance est relativement nulle.

La consommation d'acide L-malique en culture mixte a été achevée avant que cette souche E soit en phase de croissance (Figure III.39 et III.41). Il s'agit dans ce cas d'une compétition pure par rapport à l'acide L-malique.

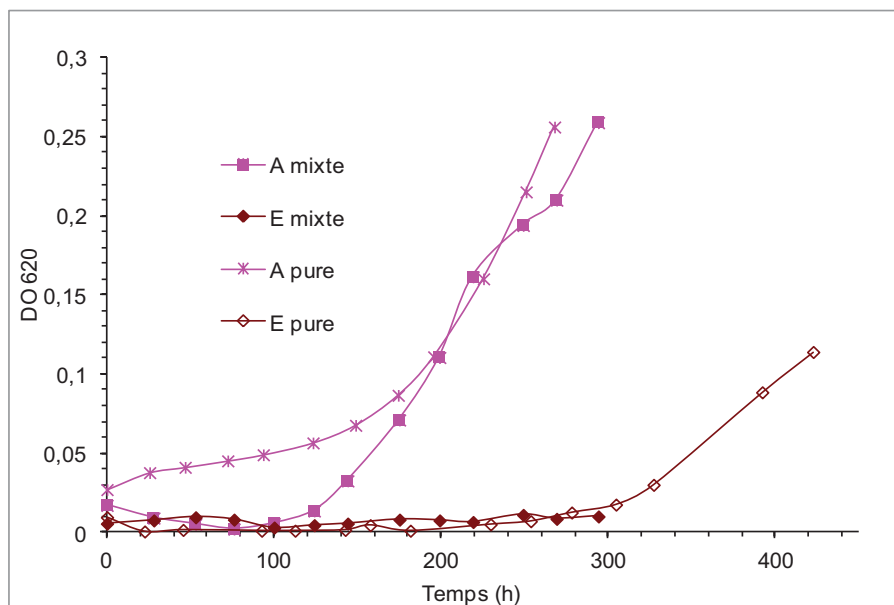


Figure III. 39. Croissances des souches d'*œni A et E* en cultures pures et en culture mixte.

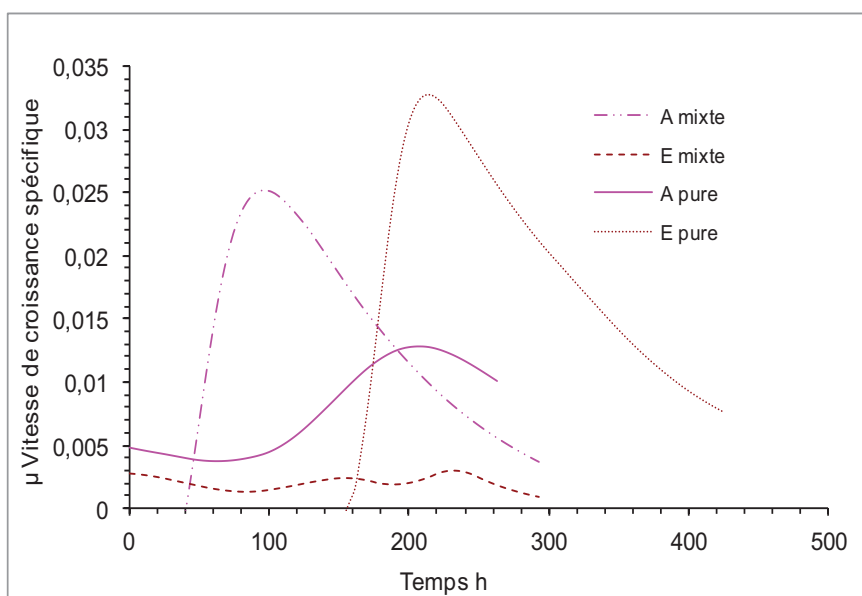


Figure III. 40. Vitesses spécifiques de croissances des souches d'*C. œni* A et E en cultures pures et en culture mixte.

La figure III.41 montre les profils de la consommation d'acide L-malique des souches A et E. La consommation expérimentale de cet acide par ces 2 souches en culture mixte est plus rapide que la consommation de chacune des 2 souches A et E en culture pure. Cela peut être justifié par l'activation de la souche A en culture mixte que nous venons de mentionner. La culture de ces 2 souches en culture mixte semble aboutir a un gain sur la durée de la FML. En effet leurs vitesses de consommation globale est 1,21 fois plus élevée que la vitesse globale de la consommation de la souche A toute seule en culture pure.

Le profil modélisé de la consommation d'acide L-malique en culture mixte est similaire à la consommation expérimentale. Cela veut dire que le lien global de proportionnalité entre l'activité spécifique de croissance (μ) et l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique (v) des 2 souches A et E est le même en culture pures et en culture mixte.

La consommation rapide de l'acide L-malique en culture mixte par rapport aux cultures pures est probablement due à la stimulation de l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique (v) par la souche A qui s'est traduit par la stimulation de sa croissance.

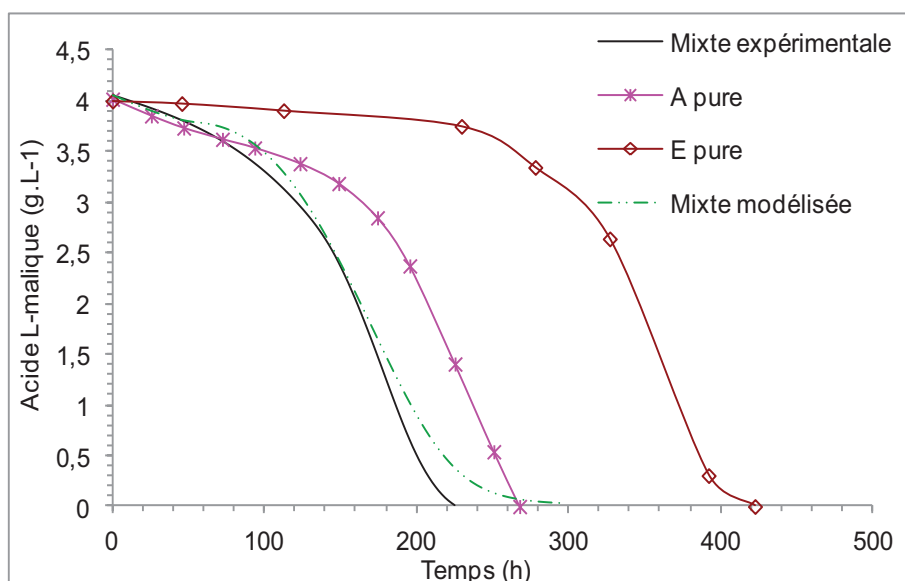


Figure III. 41. Consommation d'acide L-malique des souches A et E en cultures pures, consommation globale en culture mixte et consommation globale modélisée en culture mixte.

2.2.4. Récapitulatif des cultures mixtes

L'étude des cultures mixtes des 10 couples des 5 souches de bactéries a permis de mettre en évidence différents types d'interactions. Interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte (six couples A/B, A/C, A/D, B/C, B/D et D/C) ; interactions à effets négatifs sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effets positifs sur la croissance de la souche la plus lente en culture pure (trois couples B/E, C/E et D/E) et interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure (le couple A/E).

Le tableau III.10 résume les effets d'interactions sur la croissance et sur la consommation d'acide L-malique des différents couples en cultures mixtes étudiées. Parmi les 10 couples, les interactions exercées par les 7 couples A/B, A/C, A/D, B/D, B/E, D/C et D/E ont un effet positif sur le lien global entre l'activité spécifique de croissance μ et l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique v . Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en culture mixte il y a une activation de la consommation d'acide L-malique et/ou une inhibition de la croissance des souches. L'effet d'interaction se traduit aussi par une perte en biomasse initiale (lyse cellulaire) observée expérimentalement. On peut supposer que pour lutter contre les

conditions de culture mixte, la capacité des cellules à consommer l'acide L-malique augmente mais qu'elle ne se traduit pas forcément par une augmentation de la croissance. Par conséquent, le lien global entre les vitesses v et μ est affecté en culture mixte.

Tableau III. 11. Récapitulatif des résultats des cultures mixtes.

Culture mixte	Effet sur la croissance	Effet global sur la FML	Effet sur le lien global entre v et μ	Souche la mieux développée
<i>A/B</i>	-/-	-/-	0 et + fin culture	A
<i>A/C</i>	-/-	-/-	+	A
<i>A/D</i>	-/-	-/0	+	A
<i>B/C</i>	-/-	-/-	0	B
<i>B/D</i>	-/-	-/-	+	B
<i>D/C</i>	-/-	-/-	+	C
<i>B/E</i>	-B/+E	-/+	+	E
<i>C/E</i>	-C/+E	-/+	0	E
<i>D/E</i>	-D/+E	-/+	+	E
<i>A/E</i>	+A/compétition E	+/+	0	A

(+) : effet positif ; (0) : neutre et (-) : effet négatif

Si on compare les souches entre elles en cultures mixtes, la souche A est celle qui se développe toujours mieux en présence de l'une des autres souches (B, C, D ou E) suivie de la souche E qui se développe mieux en culture mixte avec les souches B, C et D tandis qu'elle ne se développe pas avec la souche A. Ensuite, la souche B se développe mieux en présence de l'une des 2 souches C ou E en cultures mixtes. Enfin la souche C se développe mieux en culture mixte C/D. En culture mixte l'ordre suivant est donc obtenu en terme de meilleure croissance : A, E, B et C. La souche D est toujours défavorisée en culture mixte. Néanmoins il s'agit d'une souche qui se développe faiblement en culture pure mais qui possède l'activité spécifique de consommation d'acide L-malique la plus élevée (cf. paragraphe 1.2.2.2 de ce chapitre). Cela veut dire que bien qu'une souche se développe moins en culture mixte, son activité malo-lactique peut être plus élevée que celle de la souche dont la croissance est favorisée.

Nous avons remarqué également que pour la majorité des couples, la présence de 2 souches dans le même milieu de culture aboutit au prolongement de la durée de la phase de la latence

des souches. Ces résultats nous laissent supposer qu'en culture mixte, après une durée correspondante à la durée de la phase de latence en cultures pures, les souches activent leurs systèmes de défense et produisent des métabolite(s) extracellulaire(s) qui inhibent réciproquement le développement des souches. Par conséquent cela aboutit au prolongement de la durée de la phase de latence retrouvée en culture mixte. Pour la plupart des souches en culture mixte, après cette longue phase de latence nous avons constaté que plus tard leur activité spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) devient plus élevée que celles obtenues dans leur culture pure. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'il y a une perte cellulaire au cours de cette phase de latence et ne persiste dans le milieu de culture que les cellules qui acquièrent une certaine résistance et deviennent capable de mieux supporter les conditions du milieu (culture mixte). Cette activation de la croissance peut également s'expliquer par l'atteinte d'une certaine concentration de molécule(s) extracellulaire(s) produite(s) dans les conditions de stress et qui favorise(nt) l'activité de la croissance.

Il serait souhaitable de poursuivre ces travaux pour comprendre les mécanismes de résistance d'une souche et/ou son activation (par une autre) en culture mixte.

En conclusion, l'évaluation des résultats des cultures mixtes a permis de démontrer une grande variabilité entre les différents couples en ce qui concerne les effets d'interaction sur la croissance et sur la consommation d'acide L-malique. Dans notre étude nous avons ciblé les interactions indirectes entre micro-organismes. Les interactions de type inhibition que nous avons constatées entre les couples des souches A, B, C, D et E ne peuvent donc être dues qu'à l'excrétion de métabolite(s) extracellulaire(s) toxique(s) en culture mixte. En perspective, l'identification de la ou des molécule(s) responsable(s) de ces interactions serait à envisager.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Oenococcus oeni est l'espèce la plus fréquente des bactéries lactiques (BL) associée à la FML du vin. Dans le procédé de vinification, la maîtrise de cette étape n'est pas toujours assurée. Pourtant une FML réussie est importante pour la qualité du vin mais aussi pour le coût de production.

Etant donné que la FML est généralement effectuée après la fermentation alcoolique (FA) par *S. cerevisiae*, elle se déroule dans des conditions physico-chimiques difficiles : concentration élevée en éthanol, pH bas, faible température, épuisement partiel des nutriments, présence d'acide gras et de dioxyde de soufre inhibiteurs. Des facteurs biologiques peuvent également intervenir comme la présence de métabolites inhibiteurs provenant des levures et probablement aussi produits par des bactéries lactiques indigènes.

Les connaissances sur *Æ. oeni* sont beaucoup moins avancées que celles sur *Saccharomyces cerevisiae*. Le projet ANR DIVOENI développé de 2008 à 2011 sur la biodiversité intra-spécifique chez l'espèce *Æ. oeni* visait à mieux caractériser cette espèce. Dans ce contexte notre travail portait sur l'étude des interactions entre souches de *Æ. oeni* dans le but de mieux comprendre ces phénomènes qui sont inévitables étant donné la flore bactérienne indigène forcément présente dans un vin. La démarche adoptée a été la suivante:

- Nous avons tout d'abord choisi dans la collection du projet 5 souches d'*Oenococcus oeni* (A, B, C, D et E) de niches écologiques différentes ; la souche A étant une souche de référence de la collection ATCC ; les souches D et E étant des souches commercialisées comme starters de FML. La première étape du travail a consisté à évaluer et comparer les comportements de ces souches en cultures pures, croissance et consommation d'acide malique, dans différentes conditions de culture (composition du milieu et environnement gazeux).
- un modèle mathématique a été proposé pour représenter le lien observé entre les cinétiques de croissance et de consommation d'acide L-malique en culture pure.
- les interactions qui peuvent exister entre chacun des 10 couples de ces cinq bactéries étudiées (commerciales et indigènes) ont été mises en évidence lors de cultures mixtes dans le Bio-Réacteur à Membrane.
- Enfin le modèle établi pour les cultures pures a été utilisé pour caractériser l'interaction en cultures mixtes

Les cultures pures ont montré des comportements assez différents entre les souches en termes de vitesses de croissance et de FML bien que la consommation des 4 g.L⁻¹ d'acide malique soit toujours complète. Leur sensibilité aux conditions de micro-aérobiose ou d'anaérobiose varie également d'une souche à l'autre, 3 souches sur 5 préférant les conditions d'anaérobiose. Pour évaluer le(s) raison(s) de cette variabilité, il faudrait explorer les mécanismes antioxydants chez cette espèce.

Pour toutes les souches la consommation de l'acide L-malique bénéficie à la croissance puisqu'un gain de productivité en biomasse allant de 1,7 à 2,7 fois a été obtenu par rapport au milieu sans acide malique, quelles que soient les conditions. Les 1.7 g.L⁻¹ d'acide citrique du milieu de culture ne sont jamais consommés totalement, que ce soit en présence d'acide L-malique ou en son absence. De plus, l'omission de l'acide L-malique n'aboutit pas forcément à une consommation supplémentaire d'acide citrique. Il faudrait donc poursuivre l'étude en quantifiant la quantité minimale d'acide malique nécessaire. Les liens existant dans le métabolisme de ces 2 acides organiques mériteraient aussi d'être précisés en étudiant notamment des ratios de concentrations différents.

Pour toutes les souches en cultures pures il a été observé que les profils de la vitesse spécifique de consommation d'acide L-malique (v) et de la vitesse spécifique de croissance (μ) se suivent. Il existe un lien de proportionnalité entre ces 2 activités bien qu'il n'y ait pas de proportionnalité entre les biomasses obtenues, les productivités et la consommation d'acide L-malique.

Cela nous a conduit à proposer un modèle mathématique qui lie les vitesses spécifiques μ et v entre elles pour chaque souche en anaérobiose grâce à 2 constantes (k_i et k_{mal}). Le modèle mathématique a été posé en supposant que les bactéries consomment l'acide L-malique parce qu'elles croissent. Cependant, suite aux expériences il s'est avéré que ce processus se réalise à l'inverse c'est-à-dire que les bactéries croissent plutôt parce qu'elles consomment de l'acide L-malique. En perspective, la réécriture du modèle sous une forme respectant le sens de la réalisation de ces phénomènes (croissance et consommation d'acide L-malique) permettrait de mieux les représenter.

L'évaluation des interactions entre les 10 couples formés à partir des 5 souches a permis de les classer en trois catégories : les interactions à effets négatifs réciproques sur la croissance des 2 souches en culture mixte (couples A/B, A/C, A/D, B/C, B/D et D/C), les interactions à

effet négatif sur la croissance de la souche la plus rapide en culture pure et à effet positif sur la croissance de la souche la plus lente en culture pure (couples B/E, C/E et D/E) et les interactions à effets positifs sur la souche la plus rapide en culture pure (couple A/E). Nous avons également remarqué que dans la plupart des cas, la présence de 2 souches dans le même milieu de culture aboutit au prolongement de la durée de la phase de la latence des souches. Cela s'explique par une mortalité plus importante dans cette phase par rapport aux cultures pures. Il serait intéressant ici de poursuivre des recherches sur les mécanismes de résistance au stress activés dans ces conditions.

Dans le but de vérifier si le lien global entre les vitesses μ et v des 2 souches est le même en culture mixte qu'en culture pure, nous avons utilisé le modèle mathématique proposé précédemment pour calculer la consommation globale d'acide L-malique par les 2 souches en culture mixte. Celle-ci a été comparée à la consommation expérimentale mesurée. Pour la majorité des couples (7 parmi 10) la consommation d'acide L-malique en cultures mixtes est plus rapide que celle attendue (modélisée) compte tenu des croissances obtenues, plus faibles qu'en culture pures. Tout ce passe donc comme si l'activité de consommation d'acide malique observée ne donnait pas lieu à la même croissance qu'en pur. Autrement dit on peut supposer la présence d'un métabolite qui inhibe la croissance mais pas la FML. A l'inverse on peut interpréter le phénomène comme une consommation d'acide malique plus grande pour une même croissance.

Dans ce travail nous avons évalué la consommation d'acide L-malique en culture mixte de manière globale. Dans le futur il serait intéressant de développer la modélisation des cultures mixtes pour pouvoir prédire sa consommation par chacune des 2 souches en culture mixte lorsqu'il n'y a pas d'interaction.

L'exploitation des résultats des cultures mixtes a permis de démontrer une grande variabilité entre les différents couples en ce qui concerne les effets d'interaction sur la croissance et sur la consommation d'acide L-malique. Les effets constatés tant positifs que négatifs sont sans contact direct, donc uniquement dus à l'excrétion de métabolite(s) extracellulaire(s) ou à des phénomènes de compétition possibles dans certains cas. Les recherches restent à poursuivre sur la nature de ces agents responsables d'une inhibition ou d'une stimulation entre 2 souches. Il serait également important d'effectuer les cultures mixtes dans le milieu vin pour voir si les effets observés seront aussi reproduits dans un environnement réel.

Références bibliographiques

A

Albasi C, Tataridis P, Salgado Manjarrez E, Taillandier P (2001) A new tool for the quantification of micro-organisms interactions dynamics. *Industrial and Eng. Chem. Research.* 40: 5222-5227.

Alberto MR, Farias ME, de Nadra MCM (2001) Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 4359-4363.

Alexandre H, Grandvalet C, Guilloux-Benatier M, Remize-Barnavon F, Tourdot-Maréchal R (2008) *Les bactéries lactiques en œnologie.* Lavoisier, Paris, 173 pages.

Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA (2005) Contact dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science.* 309: 1245-1248.

Arendt EK, Neve H, Hammes WP (1991) Characterization of phage isolates from a phagecarrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 220-224.

Arnink K, Henick-cling T (2005) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Ænococcus œni* strains on successful malolactic conversion in wine. *AM J Enol&Vitic.* 56: 228-237.

Asmundson RV, Kelly WJ (1990) The effect of temperature and ethanol concentration on the growth of *Leuconostoc oenos*. In: Williams PJ, Davidson D, Lee TH (Eds), *Proceedings of the seventh Australian wine industry technical conference, 14-16 August 1989, Adelaide, S.A* Winetitles, 251-252.

Augagneur Y, Ritt JF, M. Linares D, Remize F, Tourdot-Maréchal R, Garmyn D, Guzzo J (2007) Dual effect of organic acids as a function of external pH in *Ænococcus œni*. *Arch. Microbiol.* 188:147–157.

B

Bassler BL, Losick R (2006) *Bacterially Speaking.* j.cell.: 04.001

Bauer R, Chikindas ML, Dicks LMT (2005) Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Int. J. Food. Microbiol.* 101: 17-27.

Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdiou D (2008) Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J of Food Microbiol.* 122: 312-320.

Bordons A, Cerme Masque M, Vidal M (1998) Isolation and selection of malolactic bacteria and effect of pesticides. In: “The management of malolactic fermentation and quality of wine, Rencontres Lallemand, Verona 16-17 avril, 17-22.

Buchanan, RE (1918) Life's phase in bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 23: 109-125

C

Cavin JF, Divies C, Guzzo J (1998) La fermentation malo-lactique. Dans : Œnologie, fondements scientifiques et technologiques. 503-533. Lavoisier(Eds), Paris.

Castro-Martinez C (2007) *Brettanomyces bruxellensis* : Étude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Campos FM, Couto JA, Hogg TA (2003) Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Œnococcus œni* and *Lactobacillus hilgardii*. J. Appl. Microbiol. 94: 167-174.

Caridi A, Corte V (1997) Inhibition of malolactic fermentation by cryotolerant yeasts. Biotechnol. Lett. Vol 19. 8: 723–726.

Carrau FM, Neirotti E, Gioia O (1993) Stuck wine fermentation: effect of killer/sensitive yeast interactions. J. ferment. Bioeng. 76: 67-69.

Carreté R, Teresa Vidal M, Bordons A, Constanti M (2002) Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Œnococcus œni*. FEMS Microbiol. Lett. 211: 155-159.

Chung W, Hancock REW (2000) Action of lysozyme and nisine mixtures against lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 60: 25–32.

D

De Souza Oliveira RP, Perego P, Converti A, De Oliveira N (2009). Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. LWT. Food Sci. Technol. In press.

Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Œnococcus œni*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 395-397.

Du toit M, Engerlbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S (2010) *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. Food Bioprocess Technol. 4:876-906.

E

Ellermeier C, Hobbs EC, Gonzalez-Pastor JE, Losick R (2006) A three-protein signal transduction pathway governing the response to a cannibalism toxin. Cell. 124: 549-559.

G

Garbay S (1994) Recherche de mode d'adaptation de *Leuconostoc oenos* au vin : relations avec la constitution lipidique et protéique de la membrane plasmique. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux II.

Garcia-Ruiz A, Bartolome B, Martinez-Rodriguez AJ, Pueyo E, Martin-A lvarez PJ, Moreno-Arribas MV (2008) Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Contr.* 19: 835–841.

Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M (1995) Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and oil the metabolism of wine microorganisms. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 486-492.

Guilloux-Benatier M, Le Fur Y, Feuillat M (1998) Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Cenococcus æni*. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 20: 144–149.

Guilloux-Benatier M, Pageault O, Man A, Feuillat M (2000): Lysis of yeast cells by *Cenococcus æni* enzymes. *J. of Indus. Microbiol. Biotechnol.* 4: 193-197

Guilloux-Benatier M, Chassagne D (2003) comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J agricult. Food Chem.* 51: 746-751.

Guerrini S, Mangani S, Granchi L, Vincenzini M (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol.* 44(5): 374-8.

Guiral S, Mitchell TJ, Martin B, Claverys JP (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumonia*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 8710-8715.

Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Minervini F, Limitone A (2007) Cell–cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.*120: 34–45.

Gonzalez-Pastor JE, Hobbs EC, Losick R (2003) Cannibalism by sporulating bacteria. *Science.* 301: 510-513.

H

Håvarstein LS, Martin B, Johnsborg O, Granadel C, Claverys JP (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* 59: 1297-1307

Henick-Kling T (1990) pH and regulation of malolactic activity in *Leuconostoc oenos*. In: *Actualités Œnologiques 89. Comptes rendus du 4e Symposium International d'Œnologie* (Bordeaux, 1989), 320-325, Institut d'Œnologie Université de Bordeaux II, Dunod, Paris.

Holm HE, Nissen P, Sommer P, Nielsen JC, Ameborg N (2001) The effect of oxygen on the survival of non *Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of app. Microbiol.* 91: 541-547.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT et Williams ST (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Williams and Wilkins, USA.

J

Jobin MP, Garmyn D, Divies C, Guzzo J (1999) Expression of the *Ænococcus æni* trxA gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. Microbiol. 145: 1245-1 251.

K

Kim SU, Dhurjati P (1987) Analysis of 2 interacting bacterial populations with opposite substrate preferences . Biotechnol. Bioeng. 8: 1015-1023.

King SW, Beelman RB (1986) Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. Am. J. Enol. Vitic. 37: 53-60.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 12: 39–86.

Knoll C, Divol B, Du Toit M (2008) Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. Food. Microbiol. 25: 983–991.

L

Lai QP (2010) Utilisation de levures non *Saccharomyces* en œnologie : études des interactions entre *Torulasporea delbrueckii* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Dessens C (1988) Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. J. Sci. Food. Agric. 44: 183-191.

Lemaresquier H (1987) Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 4: 91-94.

M

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J (1990) Phenolic compounds in fruit processing. In: Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, FL pp. 1-91 and 323-332.

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, A. Pavlovb, Pavlov N, KaramycheV, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein D-M, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, and Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103: 15611-15616.

Manca de Nadra M C, Farias ME, Pueyo E, Carmen Polo M (2005) Protease activity of *Ænococcus æni* viable cells on red wine nitrogenous macromolecular fraction in presence of SO₂ and ethanol. Food. Contr. 16: 851–854.

Marcobal AM., Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, Mills DA (2008) Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J. Bacteriol.* 2: 564–570.

Mazzoli R, Lamberti C, Coisson JD, Purrotti M, Arlorio M, Giuffrida MG (2008) Influence of ethanol and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine. *Amino acids.* 36: 81-89.

Messens W, Verluyten J, Leroy F, De Vuyst (2003) Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41-52.

Meyer XM (2004) L'habilitation à diriger les recherches de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Miller BJ, Franz CMAP, Cho GS, Du Toit M (2011) Expression of the Malolactic Enzyme Gene (*mle*) from *Lactobacillus plantarum* Under Winemaking Conditions. *Curr Microbiol.* 68: 1682-1688.

Mills DA, 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.

N

Nehme N (2008) Étude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malo-lactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Nel HA, Bauer R, Wolfaardt GM, Dicks LMT (2002) Effect of Bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisine on Biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless Steel Surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 3.

Nielsen JC, Richelieu M (1998) Control of flavour development in wine during and after Malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *App. And Env. Microbiol.* 65: 740-745

O

Osborne JP, Edwards CG (2007) Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 27-34.

Osborne J-P, Dube Mornea A, Mira de Ordun R (2006) Degradation of free and sulphur dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *J. Appl. Microbiol.* 02947: 1365-2672.

P

Patynowski RJ, Jiranek V, Markides AJ (2002) Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Ænoccoccus æni*. *Austr. J. Grape Wine Res.* 8: 62-69.

Pommier S (2003) Dynamique de populations microbiennes en culture mixte : étude expérimentales en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisia*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Poolman B, Molenaar D, Smid EJ, Ubbink T, Abbe T, Renault PP, Konings WN (1991) Malolactic Fermentation: Electrogenic Malate Uptake and Malate/Lactate Antiport Generate Metabolic Energy. *J. of Bacteriol.* 173: 6030-6037.

Pripis-Nicolau L, de Revel G, Bertrand A, Lonvaud-Funel A (2004) Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Ænoccoccus æni*. *J. of Appl. Microbiol.* 96: 1176–1184.

Pyenaud E (1981) connaissance et travail du vin. Dunod, Paris.

R

Ramon-Portugal F, Riba JP, Strehaiano P (1994) Effet « killer » : analyse cinétique et modélisation. *Actes Coll.* 8-10.03, 549-554. Dijon SFM (Ed).

Ramon-Portugal F, Delia Dupuy ML, Pingaud H, Carrillo-Leroux GA, Riba JP (1997) Kinetic study and mathematical modeling of killer and sensitive *S. cerevisiae* strains growing in mixed culture. *Bioprocess Engineering.* 17: 375-381.

Ramos A, Poolman B, Santos H, Lolkema JS, Konings WN (1994) Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc Oenos*. *J. Bacteriol.* 16: 4899-4905.

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

Reguant C, Bordons A, Arola L, Rozes N (2000) Influence of phenolic compounds on the physiology of *Ænoccoccus æni* from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 1065-1071.

Reinsch, C (1967) Smoothing by spline function. *Numer. Math.* 10, 177-183.

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grappe berrysurface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Austr. J. Grape Juice Resear.* 3 : 316-327.

Renouf V, De La Fuente FB, Murat ML (2008) Ce que coûtent réellement les levains malolactiques. *Rev. Fr. Oenol.* 232.

Renouf V, Murat ML (2010) gestion de la teneur en diacétyle des vins. *Rev. Fr. Oenol.* 240.

Remize F, Augagneur Y, Guilloux-Benatier M, Guzzo J (2005) Effect of nitrogen limitation and nature of the feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production. *J. Appl. Microbiol.* 98: 652-661

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

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A (1998) *Traité d'oenologie - tome 1 - Microbiologie du vin, vinification*, Dunod (Eds), Paris, 617 pages.

Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Zarazaga M, Torres C, Larrea FR (2007) Antimicrobial activity of nisine against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 116: 32–36.

Rosi I, Nannelli F, Giovani G (2008) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food. Sci. Technol.* 42: 525-530.

Rozes N, Peres C (1998) Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 108-111.

S

Saguir FM, Manca de Nadra (1997) Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* in synthetic media. *Microbiologie-aliments-nutrition.* 15: 131-138.

Saguir FM, Manca de Nadra (2002) Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *J of App. Microbiology.* 93: 295-301.

Salema M, Poolman B, Lolkema JS, Loureiro Dias MC and Koninds WN (1994) Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225: 289-295.

Salgado Manjarrez E (1999) Conception et mise en œuvre d'un bioréacteur a membranes pour l'étude de la dynamique de populations mixtes de micro-organismes. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

Salgado Manjarrez E, Albasi C, Riba JP (2000) A Two-Reservoir, Hollow-Fiber Bioreactor for the Study of Mixed-Population Dynamics: Design Aspects and Validation of the Approach. *Biotechnol Bioeng.* 69: 401–408.

Salih AG, Le Quere JM, Drilleau JF (2000) Effect of hydrocinnamic acids on the growth of lactic bacteria. *Sciences des Aliments*, volume 20. 6: 537-560.

Sanders JE, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J (1995) Stress Response in *Lactococcus lactis*: Cloning, Expression Analysis, and Mutation of the Lactococcal Superoxide Dismutase Gene. *Journal of Bacteriol.* 5254–5260.

Stead D (1993) The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *J. App. Bacteriol.* 75: 135-141.

Strub C (2008) Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharotrix algériensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Sugimoto S, Al-Mahin A, Kenji Sonomoto (2008) Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 324–336.

T

Taillandier P, Tataridis P, Strehaiano P (2002) A quantitative study of antagonism between *Saccharomyces cerevisiae* and *Enococcus œni*. Lallemand Technical Meetings Symposium 10, Biarritz. pp 21-26.

Tataridis P (2001) Étude des interactions entre micro-organismes du vin : du qualitative au quantitatif. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Terrade N, De Orduña RM (2009) Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. of Food Microbiol.* 133: 1-2.

V

Vasserot Y, Dion C, Bonnet E, Tabary I, Maujean A, Jeandet P (2003) Transport of glutamate in *Enococcus œni* 8403. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 307-311.

Vivas N, Augustin M, Lonvaud-Funel A (2000) Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Enococcus œni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J. Sci. Food. Agric.* 80: 1675-1678.

Z

Zott K(2008) les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec *Saccharomyces* durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique. Thèse de doctorat de l'université Bordeaux 2.

Annexes

Corrélations

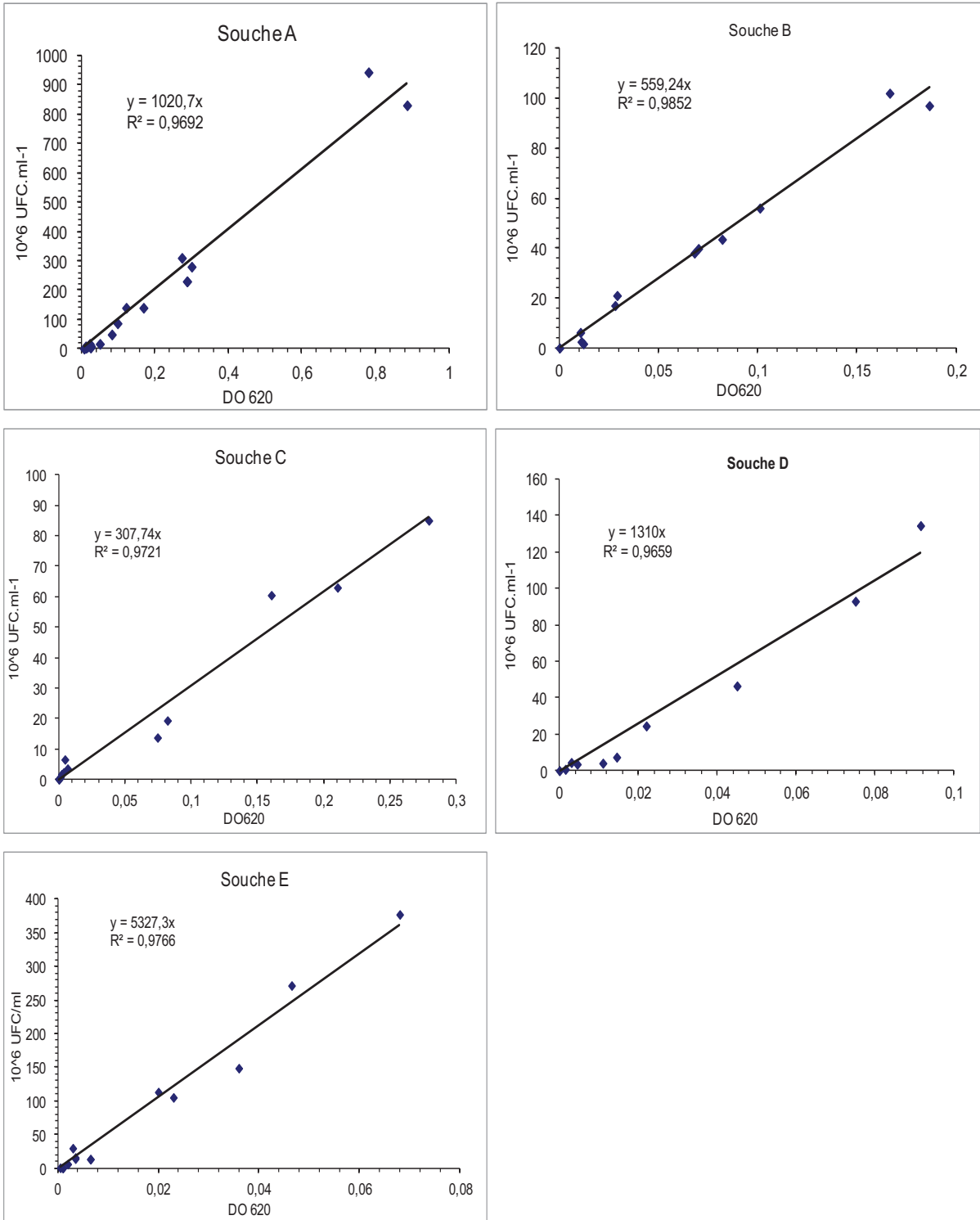


Figure 1. Concentrations en Unité Formant Colonie (UFC) en fonction de la densité optique DO₆₂₀ de chacune des souches A, B, C, D et E.