



HAL
open science

Bioversité des oenocoques dans les boissons fermentées et modalités d'interactions avec leurs bactériophages

Yasma Barchi

► **To cite this version:**

Yasma Barchi. Bioversité des oenocoques dans les boissons fermentées et modalités d'interactions avec leurs bactériophages. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0032 . tel-04880672

HAL Id: tel-04880672

<https://theses.hal.science/tel-04880672v1>

Submitted on 11 Jan 2025

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité Microbiologie

Par **Yasma BARCHI**

Soutenance prévue le 27 février 2023

**Biodiversité des oenocoques dans les boissons fermentées
et modalités d'interactions avec leurs bactériophages**

Sous la direction du Professeur Claire LE-HENAFF-LE MARREC

Membres du jury :

Mme Sophie BLEVES	Professeur à Aix-Marseille-Université	Rapporteur
Mr Pascal LE BOURGEOIS	Professeur à Université Toulouse III	Rapporteur
Mr Gilles de REVEL	Professeur à Université de Bordeaux	Examineur
Mme Claire LE-HENAFF-LE MARREC	Professeur à Bordeaux INP	Directrice de Thèse
Mme Laetitia DAURY-JOUCLA	Professeur à Bordeaux INP	Membre Invitée

Biodiversité des oenocoques dans les boissons fermentées et modalités d'interactions avec leurs bactériophages

Les bactéries à Gram positif de l'espèce *Oenococcus oeni* sont des coques fermentaires présents à la surface des baies de raisin et sur les équipements des chais. Ces bactéries lactiques sont connues pour leur rôle dans la fermentation malolactique des vins. L'intérêt croissant pour les boissons fermentées a encouragé les inventaires moléculaires de leur microbiote. Ces travaux ont révélé l'existence de niches supplémentaires pour *O. oeni* comprenant le cidre, ainsi que d'autres boissons à teneur plus réduite en alcool comme le kombucha et le kéfir. Ils ont également mis en lumière l'existence de trois nouvelles espèces dans le genre *Oenococcus*. Toutefois malgré la multiplication des études consacrées aux écosystèmes alimentaires microbiens ces dernières années un nombre limité de souches issues de niches autres que le vin a été isolé et caractérisé dans le genre *Oenococcus*. Les relations entre les espèces qui sont proches d'un point de vue phylogénétique, mais exploitent des niches différentes, restent donc peu caractérisées. Dans ce contexte, ce projet de thèse a eu pour objectif de mieux comprendre la contribution des phages dans l'évolution des oenocoques et leur biologie. Dans ce travail, nous avons (i) isolé des oenocoques à partir de kéfirs d'eau et de kombucha et décrypté leur génome (ii) évalué si les oenocoques affiliés à des espèces différentes sont connectés *via* leur phages en explorant les loci CRISPR bactériens et enfin (iii) caractérisé les modalités d'interaction entre le phage lytique X₂₇ et ses bactéries hôtes. L'ensemble de nos résultats suggèrent des traces d'infection entre les phages de *O. oeni* et de *O. sicerae*. Par ailleurs, nous avons amélioré nos connaissances sur les modalités de recombinaison entre génomes phagiques et précisé la structure de la partie caudale responsable de la reconnaissance de l'enveloppe de l'hôte. Ces résultats ouvrent la voie à l'élucidation des interactomes entre les oenocoques et leurs phages.

Mots clés : *Oenococcus*, kéfir, kombucha, CRISPR, phylogénie, phage, adhésion, partie caudale, modèle topologique, AlphaFold2.

Bioersivity of oenococci in fermented beverages and deciphering of their interactions with cognate bacteriophages

Gram positive strains of the *Oenococcus oeni* species are fermentative cocci found at the surface of berries and equipments in wineries. Such lactic acid bacteria play a prominent role during the malolactic fermentation of wines. The growing interest for fermented beverages has led to molecular inventories of their microbiota. These approaches have revealed additional niches for *O. oeni*, of which cider, and other low alcohol beverages such as kombucha and kefir. They also highlighted three novel species in the *Oenococcus* genus. Yet, despite the number of studies dedicated to food microbial ecosystems during past years, a limited number of strains that did not originate from wine have been isolated and further characterized. The relationships between phylogenetically related species, yet exploiting distinct niches, have so far received little attention. In such context, the objectives of this thesis project were to better understand the contribution of phages in the evolution and biology of oenococci. In this work, we have (i) isolated oenococci from water kefirs and kombucha and deciphered their genomic data (ii) assessed whether oenococci from distinct species are connected through their phages through the exploration of the bacterial CRISPR loci and last (iii) characterized the interactions between the lytic phage X₂₇ and its hosts. Our results suggest traces of infection between phages of *O. oeni* and *O. sicerae*. In addition, we improved our knowledge of the mechanisms responsible for recombinaison between phage genomes and detailed the structure of the tail tip which recognizes and bind to the host. Such data open the way to the deciphering of the interactome between the cell wall of oenococci and their cognate phages.

Key words: *Oenococcus*, kefir, kombucha, CRISPR, phylogeny, phage, adhesion, phage tail, topological model, AlphaFold2.

Dédicace

*Je dédie ce travail à ma magnifique famille ; mes très chers parents et mes très chère frères, source de vie
d'amour et d'affection*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.
Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés sur mon éducation et ma
formation, afin de me voir devenir ce que je suis*

Remerciements

Tout d'abord Je remercie ALLAH Le très Haut, le très Grand, le Clément, L'Omniscient, l'Omnipotent. Le Tout Puissant, le très miséricordieux d'avoir permis à ce travail d'aboutir à son terme.

La réalisation de ce travail a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance au ministère d'enseignement supérieur algérien de m'offrir une bourse d'étud ; Aussi l'université de bordeaux et le laboratoire de recherche ISVV de m'avoir accueillez pour faire cette formation, particulièrement le directeur de l'Ecole Doctorale Pr. Martin TEICHMANN ainsi que Philippe DARRIET directeur de l'unité de recherche à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin.

Je remercie Mm nathalie VIGNAIS de m'avoir aidée à faire tous les démarche administratif au niveau de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Claire LE HENAFF professeur de Microbiologie des Aliments & Virologie à l'Université de Bordeaux, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse qui m'a permis de faire mes premiers pas dans la recherche scientifique, pour sa patience et surtout ces judicieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion « il faut toujours mettre plusieurs miches de pain au four, pour être sûr qu'il y en ait au moins une qui lève », merci pour le temps que t'as consacré pour me diriger tout au long de cette thèse malgré ton emploi du temps chargé d'enseignement et engagements professionnels, merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances et expériences et ta sagesse de vie. Finalement, merci pour ta bienveillance tu as été comme une maman pour moi, et d'avoir rendu cette expérience aussi magnifique.

J'adresse tous mes remerciements à Mme Alessandra OCCHIALINI, Maître de Conférences HDR, Université de Montpellier à travers laquelle j'ai découvert ce sujet de thèse. A Mme Sophie BLEVES Professeur à Aix-Marseille-Université, Mr Pascal LE BOURGEOIS Professeur à Université Toulouse III, Mme Laetitia DAURY-JOUCLA professeur à Bordeaux INP et Mr Gilles de REVEL Professeur à Université de Bordeaux. De l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger cette thèse et pour leurs commentaires enrichissants et constructifs sur ce manuscrit.

Je tien à remercier Mr Olivier Claisse Ingénieur d'Etudes INRAE à l'ISVV, pour son aide, sa disponibilité permanente, sa gentillesse et pour sa contribution dans ce travail, ainsi que le temps qu'il a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche.

Je remercie ma famille :

Mon père Ahmed BARCHI, l'admiration que j'ai pour toi est sans limite. Grâce à toi papa j'ai appris à insister sur mes objectifs sans jamais perdre l'espoir, j'ai appris le sens du travail et de l'ambition. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. L'amour que tu m'as porté, la dignité, l'éducation et le sens de l'honneur nous servent de modèle.

Ma mère Fatiha BELGUENDOZ, Toutes ces années d'études depuis la maternelle jusqu'à ce jour ne pouvaient être pour moi un succès sans tes bénédictions, ton amour et tes sacrifices. Tu nous as aimés, éduqués et dorlotés tout en nous apprenant d'être compatissants, serviables, modestes et tolérants. Sois sûre ma magnifique mère que tes leçons dispensées ont été bien apprises... Merci pour votre soutien ! Mon cher frère Farhat BARCHI, pour tous les moments d'enfance passés avec toi mon frère/ mon meilleur ami/ l'épaule sur laquelle je me cale, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apportée. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

Mon cher frère Ibrahim BARCHI, Avoir un petit frère comme toi est le plus beau cadeau que l'on puisse

avoir. Merci pour le soutien et le réconfort que tu m'as apporté et ta gentillesse. Tu as apporté beaucoup de bonheur à notre famille.

Ma chère Amel CHAIB, Tu m'as toujours offert de soutien et de réconfort. On partager ensemble plein de moments inoubliables, des sourires, des larmes...tu as été la sœur que la vie m'a offerte Amoula. J'exprime envers toi une profonde admiration, reconnaissance et attachement inconditionnels. Ainsi que tout membre de ma grande famille (grands-parents, tante, oncles et cousins), merci pour votre soutien, encouragements et votre bonté exceptionnelle.

Finalement, je remercie mes chères amies, Pauline ROUSSERI "mapoulette", Inés ELALI "nouna", Florencia Oviedo "flora", Hugo MASTIN, Justin GARBAY "juju", Pierre MOULIS, Paul LE MONTAGNE, Sara WINDHOLTZ, Xavier HASTOY, Gauthier LAGARDE. Vous étiez pour moi comme une deuxième famille sur la quelle j'ai peux compter, merci pour votre soutien, encouragement et de m'avoir laissez plein de beaux souvenirs. Sans oublier Mannon FERREIRA, Roy LAFON, Morgane BATAILLE, Sayoko MATSUMOTO, Asma ES-SARSOUT, Hiba LAYOUNI, Nawel BENBOUGUERRA, Adla BENOUELHA, D. Nassim, Ayoub JAA, Jules HARROUARD, Julie MIRANDA, Edouard PELONNIER, Adelin VIGNAULT. Je vous remercier tous de m'avoir toujours offert un soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Table des Matières

ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	2
INTRODUCTION GENERALE.....	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
I Les aliments fermentés	8
I - 1 Historique et évolutions	8
I - 2 Les impacts et bénéfices de la fermentation	9
I - 3 Les boissons fermentées	12
I - 3 - 1 Les vins.....	14
I - 3 - 2 Le kombucha.....	17
I - 3 - 3 Les kéfirs	19
II Les bactéries lactiques, des acteurs majeurs des aliments fermentés	24
II - 1 Généralités	24
II - 2 Taxonomie des BL.....	26
II - 3 Concepts GRAS et QPS.....	27
II - 4 Les apports bénéfiques des BL dans l'alimentation	28
II - 5 Les BL et l'altération des aliments	30
II - 6 Les effets des BL résultent d'interactions avec d'autres entités	31
III Les bactéries associées au genre <i>Oenococcus</i> et leurs habitats	32
III - 1 <i>O. oeni</i> est affiliée aux vins et au cidre.....	32
III - 2 Les espèces du genre <i>Oenococcus</i> sont également associées à d'autres boissons et produits fermentés. 36	
III - 3 Signatures pour le genre <i>Oenococcus</i> et différences entre les espèces.....	37
IV Les interactions hôtes-phages	40
IV - 1 Définitions	40
IV - 2 L'adhésion des phages caudés aux enveloppes des bactéries	43
IV - 3 Les cycles lytiques et lysogéniques chez les phages caudés	45
IV - 3 - 1 Les phages virulents	45
IV - 3 - 2 Les phages tempérés	47
IV - 4 Autres cycles adoptés par les phages	50
IV - 4 - 1 L'infection chronique.....	51
IV - 4 - 2 Pseudo-lysogénie.....	51
IV - 4 - 3 Le carrier state.....	52

IV - 5 Mécanismes bactériens de résistance aux phages	53
IV - 5 - 1 Le blocage d'adsorption des phages	53
IV - 5 - 2 Les systèmes d'exclusion de surinfection (Sie) par blocage de l'injection.....	54
IV - 5 - 3 Systèmes agissant par interférence avec les acides nucléiques	55
IV - 5 - 4 Systèmes d'infection abortive ou suicides.....	57
IV - 6 Contre-mesures développées par les phages	57
IV - 7 Co-évolution et scénarii d'interactions dans les écosystèmes	58
IV - 7 - 1 Faibles variabilité et diversité des populations.....	59
IV - 7 - 2 Fortes variabilité et diversité des populations.....	59
V Les interactions BL-phages dans les aliments fermentés	60
V - 1 Nouvelles approches au service de l'exploration des interactions hôtes-phages dans les aliments fermentés	60
V - 1 - 1 La détection et la quantification sans à priori.....	60
V - 1 - 2 L'accès aux viromes	61
V - 2 Les attaques virales en cours de fermentations et leur impact	62
V - 2 - 1 Milieu laitier	62
V - 2 - 2 Fermentation du cidre.....	63
V - 2 - 3 Les vins et la FML	64
V - 3 Les phages et le biocontrôle dans les aliments.....	69
 MATERIELS ET METHODES	 73
I Bactéries : conditions de culture, identification et conservation.....	74
I - 1 Bactéries utilisées.....	74
I - 2 Conditions de culture et de conservation	75
I - 3 Suivi de la croissance bactérienne	75
I - 3 - 1 Par spectrophotométrie.....	75
I - 3 - 2 Dénombrement sur milieu gélosé	76
I - 4 Identification par MALDI-TOF	76
 II Interactions hôtes-phages	 77
II - 1 Préparation de stocks concentrés à partir de lysats purs.....	77
II - 1 - 1 En milieu solide.....	77
II - 1 - 2 En milieu Liquide.....	77
II - 2 Préparation de lysats après induction de souches lysogènes	77
II - 3 Dénombrement de phages infectant le genre <i>Oenococcus</i>	78
II - 4 Mise en conservation de bactériophages	79
II - 5 Observation en microscopie électronique MET	79

II - 6 Spectre de résistance.....	80
II - 7 Capacité d'adsorption du phage sur une souche sensible	80
II - 8 One step growth	80
II - 9 Sélection de mutants insensibles au phage lytiques (BIMs)	82
III Biologie moléculaire et outils d'analyses bio-informatique	82
III - 1 Extraction d'ADN génomique bactérien	82
III - 1 - 1 Extraction d'ADN génomique.....	82
III - 1 - 2 Extraction sur carte FTA® CloneSaverTM.....	83
III - 2 Extraction d'ADN génomique phagique	83
III - 3 Amplifications d'ADN par PCR	84
III - 4 Typage par MLVA des souches de l'espèce <i>O. oeni</i>	86
III - 5 Migration d'acides nucléiques par électrophorèse.....	86
III - 5 - 1 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	86
III - 5 - 2 Electrophorèse capillaire à puce MultiNA.....	87
IV Outils bio-informatiques.....	87
 RESULTATS ET DISCUSSION	 89
 CHAPITRE I Recherches de bactéries du genre <i>Oenococcus</i> dans des niches peu ou pas explorées : le kombucha et le kéfir de figes.....	 90
I Isolement de souches de Kombucha.....	91
I - 1 Identification et caractérisation des BL à partir de kombucha.....	91
I - 2 Evaluation de la présence de prophages	92
I - 2 - 1 par induction à la mitomycine C	92
I - 2 - 2 Par PCR.....	93
I - 3 Conclusions.....	94
II Isolement d'oenocoques à partir de kéfir de figes.....	96
II - 1 Isolement et identification	96
II - 2 Caractérisations préliminaires de la souche CRBO2176	97
II - 2 - 1 Recherche des caractères différentiels entre les espèces <i>O. oeni</i> et <i>O. kitaharae</i>	97
II - 2 - 2 Présence de prophages.....	99
II - 3 Conclusions.....	99
III Analyses préliminaires des données génomiques des souches isolées de kombucha et de kéfir	100
III - 1 Caractéristiques associées aux souches de l'espèce <i>O. kitaharae</i>	100
III - 1 - 1 Analyses du génome de la souche CRBO2176	100
Draft genome sequence of <i>Oenococcus kitaharae</i> CR02176, isolated from a home-made water kefir.....	101

III - 1 - 2 Comparaisons entre les souches CRBO2176 et DSM17330.....	104
III - 1 - 2 - a La souche CRBO2176 ne contient pas de mutation dans le gène mle	104
III - 1 - 2 - b Autres différences entre les souches de Shochu et de kéfir d'eau	105
III - 1 - 3 Mise au point d'une PCR spécifique de l'espèce <i>O. kitarahae</i>	109
III - 2 Les souches de kombucha appartiennent au phygroupe D.....	110
III - 3 Eléments mobiles présents chez les oenocoques associées au kombucha et au kéfir	112
IV Conclusions du chapitre	113
CHAPITRE II Les oenocoques affiliés à des espèces différentes sont connectés via leurs phages.....	115
Phage Encounters Recorded in CRISPR Arrays in the Genus <i>Oenococcus</i>.....	116
CHAPITRE III Caractérisation des oenophages du genre Krappator	135
Avant-propos.....	136
Expanding the repertoire of lytic phages infecting the wine lactic acid bacterium <i>Oenococcus oeni</i> with the proposal of a new genus "Krappator"	138
CONCLUSION GENERALE.....	179

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Atomic Force Microscopie

ANI : Average nucleotide identity

ARN ou RNA : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BA : Bactérie acétique

PEG : Polyethylene glycol

BET : Bromure d'éthidium

BIM : Bacteriophage insensitive mutant

BL : Bactérie lactique

CBM : Carbohydrate-binding module

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRB OENO : Centre de ressources biologiques œnologique

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

ddPCR : Digital Droplet PCR

DLS : Dynamic Light Scattering

DO : Densité Optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EPS : Exopolysaccharides

FA : Fermentation Alcoolique

FML : Fermentation malolactique

g : grammes

GBDP : Genome-BLAST Distance Phylogeny

h : heures

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

JR : Jus de raisin

L : litre

MC : Mitomycine C

MCP : Major Capsid Protein

MET : Microscopie électronique à transmission

min : minutes

MLST : Multilocus Sequence Typing

MOI : Multiplicity of infection

ORF : Open Reading Frame

pb : paire de base

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

RBP : Receptor Binding Protein

RM : Système de restriction-modification

RSS : Recombinaison site spécifique

sec : seconde

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SO₂ : Dioxyde de soufre

TMP : Tape-length Measure Protein

UFC : Unité formant colonie

UFP : Unité Formant Plages

v/v : volume/volume

VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

Liste des figures

Figure 1 Mécanismes de formation des composés du goût dans les boissons alcoolisées et dans la cavité orale.....	10
Figure 2 Gènes et voies impliqués dans le métabolisme de l'acide L-malique chez <i>O. oeni</i>	16
Figure 3 Fabrication et principaux effets santé attribués au kombucha.....	18
Figure 4 Aspect des grains de kéfir d'eau et de lait.....	20
Figure 5 Étapes de la fabrication traditionnelle du kéfir de figue.....	21
Figure 6 Grains de kéfir d'eau obtenus en procédés industriel (a) et domestique (b).....	23
Figure 7 Métabolismes carbonés des bactéries lactiques.....	24
Figure 8 Classes de composés volatiles dans le yaourt.....	28
Figure 9 Représentation schématique de la prévalence des BL (gauche) et des applications dans le domaine de la santé (droite).....	30
Figure 10 Les types de communautés microbiennes et de co-cultures, leur utilisation, bénéfiques et quelques exemples d'application.....	32
Figure 11 Les applications présentes et futures pour l'utilisation de BL dans la production de vins.....	36
Figure 12 Principaux morphotypes de phages à ADN et à ARN (A) et détail de la morphologie des phages filamenteux (B).....	41
Figure 13 Nouvelle classification des virus proposée en 2020 par l'ICTV.....	42
Figure 14 Représentation schématique de la structure de l'extrémité de la queue du phage TP901-1 (espèce P335) infectant la BL <i>Lactococcus lactis</i>	43
Figure 15 Enchevêtrement des structures de surface chez les bactéries à Gram positive reconnues par les phages.....	44
Figure 16 Représentation schématique des cycles lytiques et lysogéniques.....	47
Figure 17 Décryptage du mécanisme arbitrium.....	49
Figure 18 Modifications phénotypiques conférées par des morons.....	50
Figure 19 Moyens utilisés par la bactérie pour bloquer l'adsorption.....	54
Figure 20 Mécanisme CRISPR/Cas (type II).....	56
Figure 21 Mécanismes d'action de quelques systèmes abortifs.....	58
Figure 22 Représentation des sites d'intégration des prophages complets.....	67
Figure 23 Organisations des gènes impliqués dans la reconnaissance de la paroi de <i>O. oeni</i> par les phages.....	68
Figure 24 Applications des phages et enzymes dérivées dans le secteur alimentaire.....	71
Figure 25 Technique de la double-couche.....	78
Figure 26 Les différentes étapes du protocole de "one-step-growth".....	81
Figure 27 Schéma d'isolement et d'identification de souches de bactéries lactiques à partir de boissons fermenter.....	91
Figure 28 Croissance des souches de kombucha en milieu MRS avec ou sans mitomycine C.....	92
Figure 29 Stratégie de détection de la lysogénie chez <i>O. oeni</i> et localisation du/des prophages dans le chromosome bactérien.....	93
Figure 30 Occupation des sites attBA-F chez les souches isolées de kombucha.....	95
Figure 31 Comparaison de la croissance des <i>O. kitaharae</i>	97
Figure 32 Comparaison de la croissance des souches <i>O. kitaharae</i> en présence d'éthanol.....	98
Figure 33 Cinétique de dégradation de l'acide malique par <i>O. kitaharae</i> CRBO2176 et NRIC0647.....	98
Figure 34 Courbe d'induction de la souche <i>O. kitaharae</i> CRBO2176 par mitomycine.....	99
Figure 35 Comparaisons des ORFs spécifiques des génomes des souches DSM17330T et CRBO2176.....	104
Figure 36 Comparaison des cadres de lecture du gène <i>mle</i> chez <i>O. kitaharae</i> DSM17330.....	104
Figure 37 Organisation structurale et fonctionnelle du transporteur Opp chez les bactéries à Gram-positif.....	106
Figure 38 Structure des opérons dédiés au transport d'oligopeptides chez les deux souches de	

l'espèce <i>O. kitaharae</i> . Le second locus présent chez la souche DSM17330 est en aval du gène codant la malate perméase.....	107
Figure 39 Structure du locus eps1 chez <i>O. oeni</i> et chez <i>O. kitaharae</i>	108
Figure 40 Schéma de la localisation des polysaccharides riches en rhamnose chez quelques bactéries à Gram positive présentant une forme de coque.....	109
Figure 41 PCR spécifique proposée pour l'espèce <i>O. kitaharae</i>	110
Figure 42 Arbre phylogénétique des souches isolées dans cette étude.....	111
Figure 43 Représentation des aliments renfermant des oenocoques et des redondances de niche observées pour les 4 espèces décrites.....	114

Liste des Tableaux

Tableau I Principales fermentations et microorganismes impliqués.....	8
Tableau II Production de composés aromatiques à partir de précurseurs glycosylés par les microorganismes des boissons fermentées.....	10
Tableau III Effets santé potentiellement attribués aux végétaux fermentés.....	12
Tableau IV Principales boissons fermentées dans le monde.....	13
Tableau V Différences entre le Kéfir de lait et le Kéfir d'eau.....	20
Tableau VI Liste des souches bactériennes utilisées.....	74
Tableau VII Liste des amorces utilisées.....	85
Tableau VIII Critères de différenciation des souches appartenant aux espèces <i>O. kitaharae</i>	97
Tableau IX Fonctions différentielles entre les génomes des souches CRBO2176 et DSM17330.....	105
Tableau X Recherche des prophages vestigiaux PRC, PRD, PRG, PRH et PRI chez les souches isolées de kéfir et de kombucha.....	113

Introduction générale

Ces travaux de thèse ont été réalisés entre le 1^{er} Novembre 2019 et le 31 septembre 2022 à l'ISVV, dans l'Axe Microbiologie de l'UMR 1366, INRAE, U. Bordeaux, Bordeaux INP, Bordeaux Science Agro. Son financement a été assuré grâce à une bourse ministérielle du Gouvernement Algérien.

Au sein de cette unité de recherche, l'Axe Microbiologie travaille à l'amélioration de la qualité des boissons alcoolisées fermentées, au travers de l'étude des fermentations alcoolique et malolactique dans les vins. L'un des objets d'étude est la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, l'agent principal de la fermentation malolactique (MLF) des vins, dont le bon déroulement est un gage de qualité pour les vins. Les études s'intéressent particulièrement aux facteurs susceptibles de moduler la croissance de *O. oeni* au cours de la vinification. Dans ce contexte, l'équipe a développé des stratégies permettant l'étude des relations entre *O. oeni* et ses bactériophages et ceci dans un double objectif. Il s'agit en premier lieu d'évaluer si la prédation des bactéries par les phages peut affecter quantitativement la biomasse et entraver le déroulement de la FML pendant les fermentations spontanées. Le second objectif concerne la sélection des souches commerciales, que le viticulteur peut utiliser afin de déclencher la FML et mieux maîtriser cette étape, souvent délicate. La fréquence de la lysogénie chez ces souches est variable. La présence de prophages et la connaissance de leur stabilité après implantation des levains dans le moût/vin sont des éléments à mieux caractériser pour mieux maîtriser la sélection des souches, leur production et leur trajectoire au cours de la vinification.

Les connaissances acquises ont également permis d'aborder les notions d'évolution et d'adaptation au vin dans l'espèce *O. oeni*. En effet, la prédation des bactéries par les phages au cours du cycle lytique est un moteur de sélection important au sein des populations bactériennes en milieu naturel. Par ailleurs, les bactériophages font partie des éléments génétiques mobiles et participent au transfert horizontal de gènes entre bactéries. Ces mécanismes favorisent l'adaptation aux niches et sont développés chez *O. oeni*, espèce hypermutatrice. Ils impliquent les phages tempérés. La lysogénie correspond à l'intégration d'un prophage dans le génome bactérien et peut apporter de nouvelles fonctions à la bactérie lysogénisée et/ou moduler l'expression de ses gènes. Le transfert de gènes assuré par les phages est ici limité aux gènes portés sur le génome prophagique. Un transfert visant un réservoir plus important de gènes est également possible au sein des populations bactériennes et s'appuie sur le potentiel transducteur des particules, et leur aptitude à transférer à priori

toute fonction d'une bactérie à une autre au cours du cycle infectieux.

L'espèce *O. oeni* est adaptée par excellence au milieu vin et les autres bactéries lactiques présentes aux étapes initiales de la vinification sont progressivement contre-sélectionnées. L'espèce peut également occuper d'autres niches comme le cidre et le kombucha. Ces environnements ont des conditions physico-chimiques distinctes et la composition de leur microbiote est également variable. L'adaptation à ces trois niches a entraîné une diversification chez *O. oeni*, qui est visible dans le génome des bactéries. La structure de la population s'organise en quatre groupes phylogénétiques et un phénomène de domestication est démontré pour les souches du groupe A *vis-à-vis* du vin, et est suggéré pour celles du groupe D dans le kombucha.

Une trentaine d'années après la découverte du genre *Oenococcus* et l'espèce *O. oeni*, trois nouvelles espèces, nommées *O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* et *O. kitaharae*, ont été décrites et leur caractérisation a permis d'étendre le spectre des habitats au kefir d'eau et à la canne à sucre utilisée pour produire du bioéthanol. Par ailleurs, ces données suggèrent que plusieurs espèces peuvent cohabiter dans une même niche, comme évoqué pour le cidre.

L'ensemble de ces données pose des questions sur les processus évolutifs et notamment la spéciation chez les oenocoques. Notre objectif a été de mieux comprendre la contribution des phages dans l'évolution et la biologie de ce genre de bactéries lactiques. L'une des premières difficultés était le faible nombre de souches caractérisées au sein des nouvelles espèces décrites. Par ailleurs, certaines données provenaient d'études *in-silico*, ce qui nécessitait d'isoler des souches pour confronter les données disponibles à des études de physiologie et notamment d'interactions avec les phages. Nous avons donc initié notre étude par l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches de kombucha et de kéfir et décrypté leur génome. Les résultats majeurs sont présentés dans le Chapitre 1. Dans le second chapitre, nous avons souhaité évaluer si les oenocoques affiliés à des espèces/niches différentes sont connectés *via* leurs phages. Nous avons évalué l'existence d'interactions croisées inter-espèces et/ou inter-niches. Une approche plus indirecte a consisté en l'exploration du contenu des loci CRISPR bactériens. Dans une troisième partie, nous avons focalisé notre attention sur les modalités d'interaction entre les oenophages et la paroi bactérienne chez *O. oeni* au travers de l'étude du phage lytique X₂₇. Ces études permettront d'avoir une meilleure connaissance de la dynamique de l'enveloppe chez les oenocoques.

Le manuscrit débute par une étude bibliographique qui expose les connaissances sur les aliments fermentés et les rôles joués par les bactéries lactiques. Il aborde ensuite les données récentes concernant les interactions hôtes-phages et leurs implications dans différents domaines dont celui de l'alimentation et des fermentations.

Les travaux menés au cours de ce travail de thèse ont été valorisés sous la forme des articles suivants :

□ **Yasma Barchi**, Amel Chaïb, Florencia Oviedo-Hernandez, Marion Decossas, Olivier Claisse and Claire Le Marrec (2023). Draft genome sequence of *Oenococcus kitaharae* CRBO2176, isolated from a home-made water kefir. *Gen. Microbiol Resour Announc.* 12, 4.

□ **Yasma Barchi**, Cécile Philippe, Amel Chaïb, Florencia Oviedo-Hernandez, Patrick Lucas, Olivier Claisse and Claire Le Marrec (2023). Phage encounters recorded in CRISPR arrays in the genus *Oenococcus*. *Viruses* 15, 15.

□ **Yasma Barchi**, Amel Chaïb, Cécile Philippe, Florencia Oviedo-Hernandez, Olivier Claisse, Christian Cambillau, Adeline Goulet and Claire Le Marrec.: Expanding the repertoire of lytic phages infecting the wine lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* with the proposal of a new genus 'Krappator'. (À soumettre à Appl. Env. Microbiol.).

□ Amel Chaïb, Cécile Philippe, Fety Jaomanjaka, **Yasma Barchi**, Florencia Oviedo-Hernandez, Olivier Claisse and Claire Le Marrec (2022). Phage-host interactions as a driver of population dynamics during wine fermentation: betting on underdogs. *Int. J. Food Microbiol.*, 383:109936.

□ Olivier Claisse, Amel Chaib, Fety Jaomanjaka, Cécile Philippe, **Yasma Barchi**, Patrick M. Lucas and Claire Le Marrec (2021). Distribution of prophages in the *Oenococcus oeni* species. *Microorganisms*, 9:856.

Etude bibliographique

I Les aliments fermentés

I - 1 Historique et évolutions

Premier mode de transformation et de conservation inventé par l’homme au Néolithique, la fermentation est associée à bon nombre d’aliments bien connus comme le vin, le vinaigre, la bière, les viandes fermentées, le fromage, le pain au levain, les yaourts ou encore le beurre, le chocolat et le café.

Les principes de la fermentation ont été décrits à la fin du 19^{ème} siècle au travers des premiers travaux de Pasteur, Lavoisier et Gay-Lussac. Sollicité par les propriétaires de distilleries dans le Nord, inquiets des inégalités dans leur production d’alcool de betteraves, Pasteur s’intéresse aux fermentations alcooliques et lactiques. Plus d’un siècle après la découverte de ses fondements, la définition générale de la fermentation englobe aujourd’hui tout procédé biochimique, dans lequel la plupart des micro-organismes (bactéries et/ou levures) dégradent les carbohydrates pour produire de l’énergie en conditions anaérobies, faisant ainsi référence à la première définition de Pasteur suggérant que “la fermentation est la vie en absence d’oxygène” (Voidarou *et al.*, 2020).

Sous le terme de fermentation, sont retrouvées aujourd’hui les fermentations alcoolique, lactique, butyrique, propionique et enfin acétique (Tab. I). La diversité des phénomènes associés génère une diversité de produits terminaux, parmi lesquels le CO₂, l’éthanol, les acides organiques ainsi que d’autres molécules organiques. Les composés et les microorganismes impliqués dans les synthèses sont recensés ci-dessous.

Tableau I Principales fermentations et microorganismes impliqués (d’après Voidarou *et al.*, 2020)

Type of Fermentation	Microorganisms Involved	Food/Environment	Major End Products
Alcohol fermentation	Yeasts	Wine, beer, sourdough	2 glucose → 2 glycerol + acetic acid + ethanol
Lactic acid (homofermentation)	Lactic acid bacteria (<i>Lactobacillus</i> spp. etc.)	Dairy products, fermented meats and fermented vegetables etc.	Glucose → 2 lactic acid + 1ATP (Embden-Meyerhof-Parnas)
Lactic acid (heterofermentation)	Lactic acid bacteria (<i>Lactobacillus</i> spp. etc.)		5 and 6 carbon sugars → lactic acid + acetic acid + ethanol + 1ATP
Butyric acid	<i>Clostridium</i> spp., <i>Butyrivibrio</i> spp., <i>Bacillus</i> spp. and other anaerobes	Marsh sediments, sewage systems	4 glucose → 2 acetate + 3 butyrate → butyric acid, butanol, acetoin, isopropanol, acetate, ethanol, 2,3-butadienol
Mixed acid	Enterobacteriaceae (<i>Escherichia</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Shigella</i> spp. etc.)	Human and animal digestive tract, fresh water	Glucose → acetic acid, formic acid, lactic acid, succinic acid, ethanol
Propionic acid	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Veilonella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., some <i>Clostridia</i> spp.	Dairy products	Glucose, glycerol, lactate → propionate, acetate,
Acetic acid	<i>Acetobacter</i> spp., <i>Gluconobacter</i> spp., <i>Bacillus subtilis</i>	Acetic acid industry	Oxidation of sugars, sugar alcohols, ethanol → acetic acid

Actuellement, plus de 3 500 aliments fermentés traditionnels existent de par le monde. D'origine animale ou végétale, ils représentent entre 5% et 40% des aliments consommés par les humains (Tamang *et al.*, 2016). La consommation de produits issus de la fermentation revêt une spécificité géographique : si en Europe le fromage et le pain sont particulièrement appréciés, en Afrique, les aliments fabriqués à partir de féculents fermentés (comme l'igname ou le manioc) tiennent une place importante dans l'alimentation, tandis qu'en Asie, les produits dérivés de soja ou de poissons sont consommés quotidiennement.

Le terme de fermentation a une connotation positive pour les consommateurs et l'offre répond à une demande sociétale forte en une alimentation plus saine, impliquant moins de transformations et de conservateurs. La fermentation de nouvelles matrices végétales est en plein essor et est utilisée pour créer de nouveaux produits comme alternatives végétariennes aux produits laitiers et carnés. La tendance est à la consommation d'aliments à moindre teneur en calories, associant moins de carbohydrates et plus de protéines. D'autres facteurs expliquent cette tendance, comme la pénurie globale en viande, liée à son introduction dans l'alimentation des populations asiatiques. De plus, certains consommateurs limitent leur consommation en viande en lien avec leur religion ou style de vie et/ou sont soucieux du bien-être animal et de l'environnement.

I - 2 Les impacts et bénéfices de la fermentation

Le premier bénéfice reconnu est **la conservation des aliments**, grâce notamment à l'acide lactique ou l'éthanol produits par les microorganismes : en s'accumulant dans le milieu, ces molécules inhibent le développement d'autres microorganismes potentiellement pathogènes ou responsables d'altérations organoleptiques. D'autres molécules comme des acides organiques et des peptides antimicrobiens (Todorov *et al.*, 2022) ou anti-fongiques (Abouloifa *et al.*, 2022) inhibent également le développement de nombreuses espèces, et notamment les pathogènes, responsables de toxi-infections alimentaires.

Le procédé de fermentation modifie l'aspect, la couleur et les propriétés rhéologiques de l'aliment (consistance, dureté, viscosité, l'adhérence).

La fermentation est essentielle à la **modification du profil aromatique des aliments** et leur confère une odeur et un goût typiques et agréables, favorisant l'appétence. Par exemple, les bactéries lactiques produisent des β -glucosidases et des alcool-déshydrogénases (ADH) qui produisent des profils aromatiques particuliers dans les fruits et végétaux fermentés (Licandro

et al., 2020). La production de composés aromatiques à partir de précurseurs glycosylés par les microorganismes est particulièrement importante pendant les transformations du raisin en vin (Tab.II). Il est à noter que des molécules peuvent être perçues positivement dans le vin, alors que d'autres, comme les phénols volatiles produits par la levure *Brettanomyces cerevisiae* sont dépréciatives du goût.

Tableau II Production de composés aromatiques à partir de précurseurs glycosylés par les microorganismes des boissons fermentées (d'après Schwartz et al., 2021)

Localisation	Composés aromatiques	Microorganisme	Aliment
Boissons fermentées	Terpènes ; C ₁₃ -norisoprenoïdes ; Phénols volatiles ; composés C ₆ ; Alcools aliphatiques ; Acides aliphatiques ; Composés benzéniques ; Dérivés d'acidesphénoliques	<i>Saccharomyces</i> hybrides, <i>Pichia anomala</i> , <i>Candida molischiana</i> , <i>Candida wickerhamii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Vins
	Terpènes ; C ₁₃ -norisoprenoïdes ; Composés benzéniques	<i>Oenococcus oeni</i>	Vins rouges
	Terpènes ; Alcools aliphatiques	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>B. custersii</i> , <i>B. anomalus</i>	Bières, bières aux fruits
Cavité orale	Phénols volatiles	inconnus	Vins affectés par les fumées
	Terpènes ; Composés benzéniques ; Dérivés lipidiques	inconnus	Vins blancs

Les bactéries à l'origine des molécules aromatiques du vin sont indigènes à l'environnement œnologique et correspondent parfois à des entités de la microflore buccale du consommateur (Fig. 1).

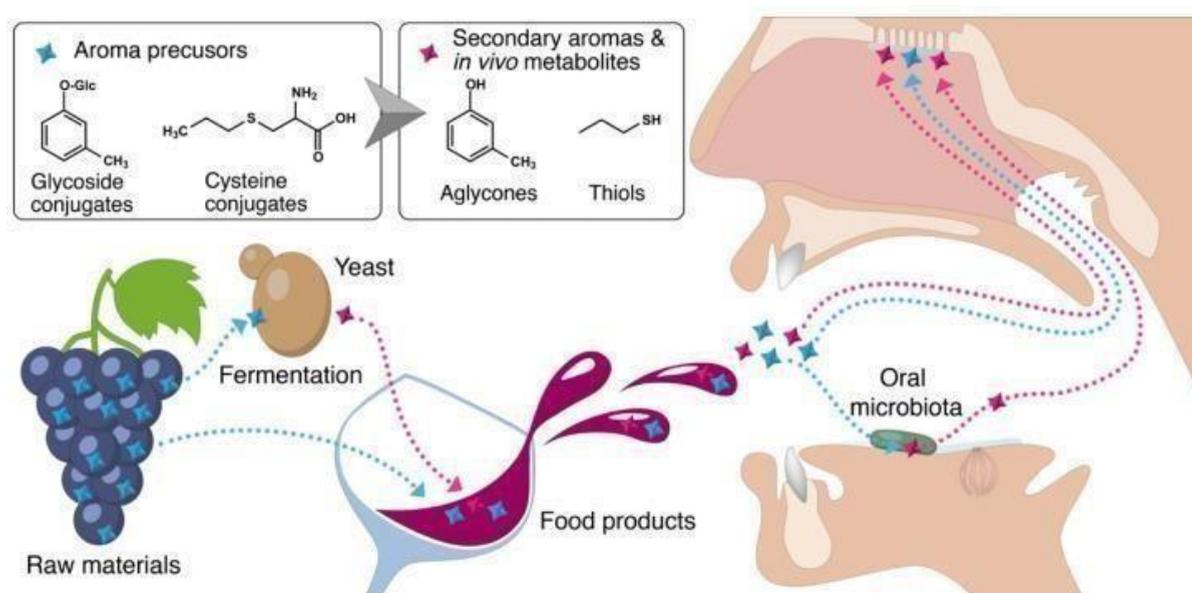


Figure 1 Mécanismes de formation des composés du goût dans les boissons alcoolisées et dans la cavité orale (Schwartz et al., 2021).

La fermentation est bénéfique pour la santé **en réduisant la concentration, ou en convertissant des facteurs anti-nutritionnels endogènes** présents dans les matières premières végétales (acides phytiques ou oxaliques, saponines, lectines, alcaloïdes). La présence de microorganismes rend comestible un produit qui ne l'était pas dans son état non transformé, *via* un effet de détoxification. Ainsi lors de la préparation du manioc amer, les racines subissent une macération, qui favorise leur fermentation ultérieure. Le procédé permet la dégradation des glycosides cyanogéniques (linamarine). En cas de persistance, ces composés se transformeraient en acide cyanhydrique, et provoqueraient de graves intoxications. Le tubercule amer mal fermenté est donc susceptible de causer des pathologies dangereuses pour l'homme. Il en est de même pour les fèves (Vicia faba L.) riches en vicine et convicine, qui sont responsables du favisme, une maladie génétique héréditaire, responsable d'anémie hémolytique. La fermentation des fèves permet l'hydrolyse de ces molécules, ce qui génère la divicine et l'isouramil, respectivement. L'effet positif est observé dès 48 h de fermentation (Rizzello *et al.*, 2016). Enfin, certaines bactéries ont l'aptitude à dégrader par oxydation les amines biogènes. Ces composés sont dérivés des acides aminés et sont produits pendant la croissance des bactéries et la fermentation. Ils englobent la putrescine, la cadavérine, la spermidine, la spermine, la tryptamine, la tyramine et la phényl éthylamine. Leur présence entraîne des effets négatifs chez le consommateur après ingestion en causant maux de tête, palpitations cardiaques, vomissements, diarrhées et crises d'hypertension. Les effets toxiques dépendent toutefois du type d'amine biogène, de la sensibilité du consommateur et de la consommation concomitante de médicaments inhibiteurs de la monoamine-oxydase, ou d'éthanol, qui interagissent avec des systèmes enzymatiques responsables de la détoxification des amines biogènes exogènes (Barbieri *et al.*, 2019). La teneur en amines biogènes dans les aliments doit être inférieure à 20 mg/kg pour les boissons alcoolisées ou non, les légumes fermentés et produits dérivés de soja, et jusqu'à quelques centaines de mg/kg pour les saucisses et fromages.

Les effets bénéfiques de la fermentation sur la santé sont multiples. La fermentation améliore la digestibilité des produits laitiers, qui peuvent être consommés par les personnes intolérantes au lactose. Cette fonctionnalité est reconnue par les autorités européennes de sécurité sanitaire des aliments, et bénéficie d'une allégation santé. Les microorganismes sont également à l'origine de divers composés bioactifs, issus de leurs métabolismes et apporteraient des fonctions anti-oxidantes, anti-thrombotiques, immunostimulantes, et

limiteraient la pression sanguine. Les études se multiplient dans le domaine des fermentations végétales (Filannino *et al.*, 2018; Gustaw *et al.*, 2021) dont les principaux effets-santés sont rassemblés **Tab. III**.

Tableau III Effets santés potentiellement attribués aux végétaux fermentés (Gustaw *et al.*, 2021)

Produits fermentés	Effets santé
Jus de pomme	Réduction de la pression sanguine
Jus de pomme	Contrôle de l'hyperglycémie
Jus de Noni	Propriétés hypoglycémiques et hépatoprotectrices
Boissons aux poires, pommes et carottes	Activité antioxidante augmentée
Vinaigre de cidre de pomme	Réponse cellulaire au stress oxydatif augmentée
Ginseng hydroponique	Activités antioxidante, anti-inflammatoire, et anti-adipogénique
<i>Diospyros lotus</i> (fruit)	Activité antioxidante et hypoglycémique
<i>Myrciaria dubia</i> Mc. Vaugh (camu-camu)	Effets sur le diabète de type 2
Lupin	Teneur en B12 augmentée
Injera	Teneur en folate augmentée
Choux	Teneur en B12 augmentée

I - 3 Les boissons fermentées

L'une des plus anciennes traces de boisson fermentée correspond à des résidus de vins issus de raisins, détectés dans des jarres enterrées dans le sud Caucase en Géorgie et datés à la période 6000–5800 ans avant JC (période néolithique) (Mc Govern *et al.*, 2017). Une grande variété de boissons fermentées est produite et consommée à travers le monde. Vins, bières et cidres sont les plus connus. Le cacao, le café et le thé en font également partie. Les fèves, les grains ou les feuilles dont ils sont issus sont mis à fermenter après récolte afin de développer des arômes caractéristiques.

Les procédés de fermentation soutiennent l'innovation dans le domaine industriel et ceci touche notamment le secteur des boissons fermentées (Cuamatzin-García *et al.*, 2022). Des boissons ancestrales comme les kéfirs (de lait et de fruits) et le kombucha sont remises au-devant de la scène (Moretti *et al.*, 2022). Leur consommation, traditionnelle en Asie centrale, s'est progressivement développée en Russie et en Europe et dans le monde aux 20^{ème} et 21^{ème} siècles. Ce mouvement a été associé à la diaspora russe, pour laquelle la production et l'import de ces boissons ont participé à une stratégie de maintien d'une identité dans le contexte

de la culture du pays d'accueil (Jayabalan *et al.*, 2014; Pechurina, 2020). Une étude récente indique que les kombuchas et les kéfirs sont présents dans 0,7 % et 0,2% des foyers français, respectivement, une partie des consommateurs étant adeptes des deux boissons (www.circuits-bio.com).

De nouvelles sources de végétaux sont valorisées dans les boissons fermentées (Cichońska *et Ziarno*, 2021; Pswarayi *et Gänzle*, 2022; Canon *et al.*, 2022) (Tab. IV). Elles intègrent les céréales (avoine, riz, millet, colza) ; les légumineuses (soja, lupin, pois, lentilles, sésame, féverole) ; les fruits à coque (noisettes, pistaches, amandes, noix); les graines (sésame, lin, coton, chanvre, tournesol); les pseudo-céréales (quinoa, amarante, sarrasin) ainsi que d'autres sources (noix de coco, betterave). Quelques exemples de boissons fermentées avec leurs caractéristiques majeures et microorganismes associés sont synthétisés dans le Tableau IV.

Tableau IV Principales boissons fermentées dans le monde
(Adapté de Baschali *et al.*, 2017; von Gastrow *et al.*, 2020; Cuamatzin-García *et al.*, 2022b)

Produit	Description	Microorganismes identifiés	Région géographique
Bushera	Céréales (sorgum)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Weissella</i> spp.	Afrique (Est)
Shamita	Orge	<i>Lactobacillus</i> spp.	Afrique (Nord-Est)
Munkoyo	Racines pilées + maïs	<i>Weissella</i> and <i>Lactobacillus</i> spp.	Afrique (Sud)
Mahewu	Maïs ou sorghum	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Afrique (Sud)
Mabisi/Amasi	Lait	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>	Afrique (Sud)
Amabere amaruranu	Lait	<i>St. thermophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , Levures	Afrique (Sud)
Marula/buganu	Jus et pulpe	Levures, <i>Lactobacillus</i> spp.	Afrique (Sud)
Motoho	Sorghum	<i>L. plantarum</i> , <i>Lim. fermentum</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Candida lambica</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. glabarata</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>G. silvicola</i>	Afrique (S)
Chibuku	Bière (sorghum)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Sac. cerevisiae</i>	Afrique (S)
Umqom-bothi	Bière (maïs, sorghum)	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Sac. cerevisiae</i>	Afrique (S)
Burukutu	<i>Sorghum bicolor</i> et millet	<i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Acetobacter</i>	Nigéria, Bénin, Ghana
Champuz	Maïs ou riz	Non déterminé	Colombie, Pérou
Chicha	Maïs	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Saccharomyces</i> .	Colombie, Pérou, Argentine
Kefir grain	Lait	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. paracasei</i>	Brésil
Axokot/Atole agrio	Maïs	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Weissella</i>	Mexique (SO)
Tepache	Ananas	<i>L. plantarum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. sp.</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i>	Mexique

Tesgüiño	Maïs	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Hansenula</i>	Mexique (N et O)
Tuba	Cocotier	Non déterminé	Mexique (O)
Pozol	Cacao et maïs	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>	Mexique (SO)
Colonche	Cactus	<i>Candida valida</i> , <i>Sac. cerevisiae</i> , <i>Torulopsis taboadae</i> , <i>Pichiafermentans</i>	Mexique (N)
Pulque	Agave	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Zymomonas</i> , <i>Saccharomyces</i>	Mexique (centre)
Kombucha	Thé	<i>Komagataeibacter xylinus</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>A. xylinum</i> , <i>A. aceti</i> , <i>Sac.</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> spp., <i>Gluconacetobacter</i>	Chine
Sake	Riz	<i>Fructilactobacillus fructivorans</i> , <i>Lactobacillus homohiochi</i> .	Japon
Kefir	Lait	<i>Lentilactobacillus kefiri</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Acetobacter</i> <i>lovaniensis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Sac. cerevisiae</i>	Russie, Europe de l'Est
Kvass	Farine de seigle, malt, pain rassis	<i>L. casei</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> ; <i>Sac. cerevisiae</i>	Europe de l'Est
Vilii Dahi/Dahdi Gwell	Lait fermenté	<i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> .	Finlande Inde, Indonésie France, Bretagne
Ayran	Yogourt salé	<i>St. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Turquie, Bulgarie, Macédoine, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Azerbaïdjan
Boza/buze	Bière de céréales	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. coprophilus</i> , <i>Ln.</i> <i>raffinolactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. brevis</i> , <i>Sac. cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>G. penicillatum</i> , <i>G. candidum</i>	Turquie, Balkans, Russie, Iran
Buttermilk	Lait	BL mésophiles	monde

Trois types de boissons seront détaillés dans la suite du document, et correspondent aux vins, au kombucha et aux kéfirs.

1 - 3 - 1 Les vins

Le vin est une boisson issue de la transformation de moût de raisin. Sa consommation remonte au Néolithique et les premiers vins étaient issus de fermentations spontanées de jus de fruits de vignes sauvages. La domestication de la vigne se serait produite dans la région du Caucase, et sa culture se serait ensuite étendue sur le bassin méditerranéen de l'Âge de Bronze à l'Antiquité (Terral and Bouby, 2013). Le savoir-faire de la vinification s'est affiné au cours des

siècles. Les itinéraires au vignoble et les procédés de vinification varient selon les cépages, les types de vins et les terroirs (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2017).

La vinification en rouge démarre par la récolte et le tri des vendanges. Les baies de raisin peuvent être ensuite totalement ou partiellement séparées des rafles. Cette étape dite de l'éraflage ou égrappage, aura une influence sur le taux de tanins et d'arômes herbacés extraits lors de la macération. L'étape suivante est le foulage qui consiste à provoquer l'éclatement des baies de raisin pour en libérer le jus avant l'encuvage. A ce stade, le sulfitage et/ou le levurage du moût peuvent avoir lieu. L'ajout de ces intrants est facultatif.

La macération donne aux vins rouges leurs spécificités par rapport aux vins blancs et notamment leur couleur. Elle provient des anthocyanes extraits des pellicules de raisin. Les pépins, pellicules, et autres solides constituent le marc. Au contact du jus et au cours de la modification du milieu, le marc libère différents types de molécules, comme des polyphénols constitués d'anthocyanes et de tanins. D'autres composants comme les arômes et les précurseurs d'arômes, des composés azotés ou des polysaccharides sont libérés. Des enzymes (pectinases ou cellulases) peuvent être ajoutées pour exacerber les phénomènes d'extraction *via* la dégradation des parois cellulaires du raisin.

La croissance des levures permet la réalisation de la **fermentation alcoolique (FA)**. Elle peut être spontanée, c'est-à-dire assurée par les levures indigènes, ou déclenchée par des levures inoculées. La FA se déroule durant la macération et y participe. Elle se traduit par une augmentation de la température, une production de CO₂ et par une baisse de densité due à l'éthanol libéré, ce qui pousse les solides à remonter à la surface pour former le « chapeau de marc ». Afin que ce chapeau reste humide et pour améliorer la macération, des pigeages (ou remontages) sont réalisés. Ils consistent à pomper le moût du fond de la cuve puis à le réintroduire en arrosant le marc. Après la FA, l'écoulage puis le décuvage ont lieu, durant lesquels le vin de goutte et le marc sont successivement recueillis. Le marc subit alors un pressurage pour obtenir le vin de presse, riche en tanins. Ces vins sont ensuite mis en élevage en barrique ou en cuve.

La plupart des vins, en particulier les vins rouges, subissent **une deuxième étape de fermentation** qui est assurée par des bactéries lactiques (BL). Si Pasteur a décrit la présence de bactéries dans les vins, c'est le chimiste Antoine-Jérôme Balard qui a identifié que la

formation d'acide lactique était liée à la croissance de bactéries dans cette matrice alimentaire (Balard, 1977). Koch démontre ensuite que le métabolisme bactérien assure la conversion de l'acide malique en acide lactique (Bartowsky, 2005), et cette étape prendra le nom de fermentation malolactique, ou FML. Elle peut être menée par des BL des genres *Oenococcus*, *Pediococcus* et *Lactiplantibacillus*. Toutefois, dans les vins acides, c'est *O. oeni* qui en est responsable, car l'espèce a un caractère acidophile plus marqué (Lorentzen et Lucas, 2019). D'un point de vue biochimique, la FML consiste en la décarboxylation de l'acide dicarboxylique L-malique, au goût âpre, en acide L-lactique, plus doux, et en CO₂. Trois gènes organisés en opéron sont responsables de la FML chez *O. oeni* : la perméase à L-malate *mleP*, l'enzyme malolactique *mleA* et le régulateur transcriptionnel situé en amont, *mleR*.

L'enzyme malolactique requiert la présence des cofacteurs NAD⁺ et Mn²⁺ pour son activité. La cellule produit de l'énergie en générant un gradient de pH de part et d'autre de la membrane plasmique. La libération de L-lactate s'accompagne de celle de proton ce qui augmente le pH intracellulaire et génère une force protonmotrice permettant aux ATPases membranaires de produire de l'ATP (Fig. 2). Le terme fermentation est un abus de langage utilisé par analogie à la FA, puisqu'il s'agit uniquement d'une décarboxylation ne faisant pas intervenir d'intermédiaires réduits ou oxydés.

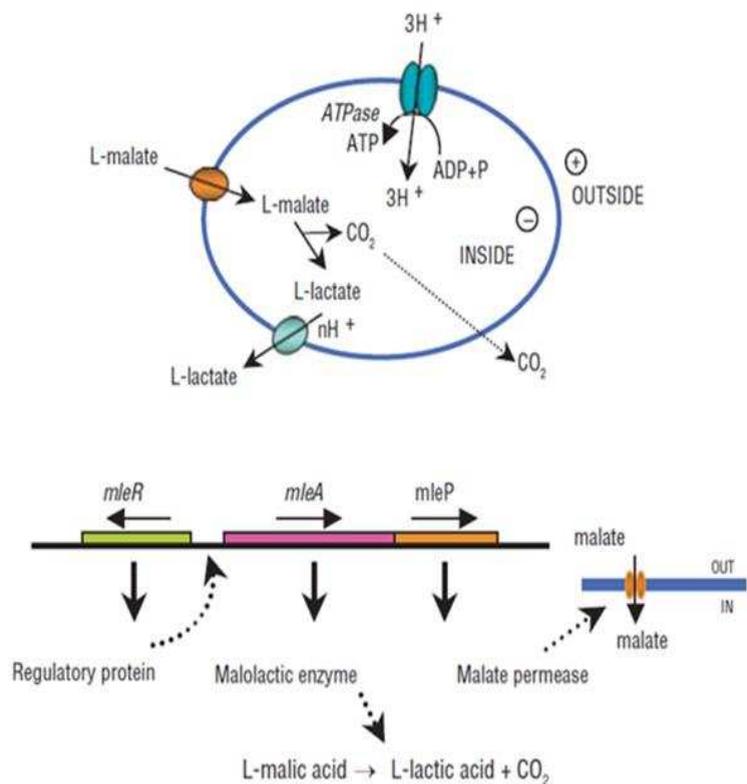


Figure 2 Gènes et voies impliqués dans le métabolisme de l'acide L-malique chez *O. oeni*

La FML stabilise le vin d'un point de vue microbiologique en épuisant les substrats carbonés résiduels métabolisables et vraisemblablement *via* la production de composés antimicrobiens (Lonvaud-Funel, 1995, 1999a; Bartowsky, 2005, 2017). La FML, qui participe à la tolérance d'*O. oeni* à l'acidité, **mène également à une légère désacidification** (+ 0,1-0,2 de pH), ce qui améliore la qualité gustative des vins (Lonvaud-Funel, 1995, 1999; Bartowsky, 2005; Lerm et al., 2010; Sumby et al., 2019; Bech-Terkilsen et al., 2020).

La FML apporte leur souplesse et leur rondeur à la plupart des vins rouges. C'est également pourquoi cette fermentation n'est pas désirée dans des vins blancs pour lesquels on souhaite conserver les arômes variétaux liés au raisin (fraîcheur), que la FML estompe. Un des **impacts sensoriels majeurs de la FML** est également la production de diacétyl, de composés cétoniques issus du métabolisme de l'acide citrique, et d'esters (lactate d'éthyle et succinate de diéthyle) (Moreno- Arribas *et al* Polo, 2005; Lerm *et al.*, 2010; Gammacurta *et al.*, 2018; Trujillo *et al.*, 2022). Enfin, **les BL influencent et stabilisent la couleur des vins** par différents mécanismes. Par exemple, certaines glycosidases (ou anthocyanases) vont hydrolyser des anthocyanes en anthocyanidines qui sont brunes ou incolores pour en libérer le sucre. A l'inverse, elles peuvent consommer l'éthanal qui est connu pour se conjuguer aux anthocyanes (Liu, 2002 ; Lerm *et al.*, 2010).

1 - 3 - 2 Le kombucha

La boisson est apparue pour la première fois en 220 av. J.-C. dans le nord-est de la Chine (Manchourie), en Corée et au Japon (de Miranda *et al.*, 2022) où elle était considérée comme un remède d'immortalité, détoxifiant et énergisant (Fig. 3). Il s'agit d'une boisson fermentée pétillante à base de thé noir, vert ou wu-long «*Camellia sinensis* ». Elle est obtenue à partir d'un sirop sucré, qui contient très peu d'alcool (<0,5%) et de dioxyde de carbone (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Sa saveur est légèrement aigre-douce. L'éthanol et les acides organiques obtenus contribuent à l'activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries pathogènes ou des moisissures. Dans le commerce, on trouve un panel de saveurs différentes, obtenues grâce à l'ajout d'infusions de menthe, de mélisse ou de jasmin (Jayabalan *et al.*, 2016). En 2021, 215 entreprises commerciales de kombucha sont dénombrées à travers le monde, principalement en Amérique du Nord (69,8%), et en Europe (16,3%). Le marché européen devrait atteindre 730 millions de dollars d'ici à 2024, les principaux pays consommateurs étant le Royaume-Uni, l'Allemagne, l'Italie et l'Espagne.

La boisson est parfois nommée « thé champignon » car elle est obtenue grâce à une communauté symbiotique de micro-organismes nommée SCOBY (Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast), composée de BL, bactéries acétiques (BA), champignons et levures (Fig. 3). Sa composition est variable selon l'origine, le climat, l'emplacement géographique et le milieu utilisé pour le processus de fermentation. Les microorganismes adhèrent à une membrane cellulosique et forment ainsi un biofilm flottant qui se crée au cours de la fermentation. Les conditions idéales de fermentation du kombucha sont obtenues en ajoutant le consortium

symbiotique de Kombucha (30g/100 ml) à un mélange d'eau, de thé et de sucre pendant 10 jours à 25°C en aérobiose (Neffe-Skocińska *et al.*, 2017). D'autres travaux montrent que la température de 30°C contribue à une grande diversité microbienne, et permet la sélection de différentes espèces du genre *Gluconacetobacter*, responsables de la production d'acides organiques (De Filippis *et al.*, 2018).

Après quelques jours de fermentation, un nouveau SCOBY flotte sur la surface. La boisson obtenue est alors filtrée, pour éliminer le SCOBY et les restes de cellulose en suspension. Pour éviter la surproduction d'alcool et de dioxyde de carbone par les micro-organismes résiduels, le maintien de la boisson sous réfrigération, la pasteurisation ou l'ajout de conservateurs est conseillé (Kim et Adhikari, 2020).

Le SCOBY pourra être utilisé pour une nouvelle fermentation. Son stockage est recommandé dans un liquide sucré à température ambiante (16-38°C). Le froid peut réduire la viabilité des BL et bactéries acétiques (BA) et favoriser la croissance de micro-organismes indésirables (Nematollahi *et al.*, 2016; Carvalhaes et Andrade, 2020).

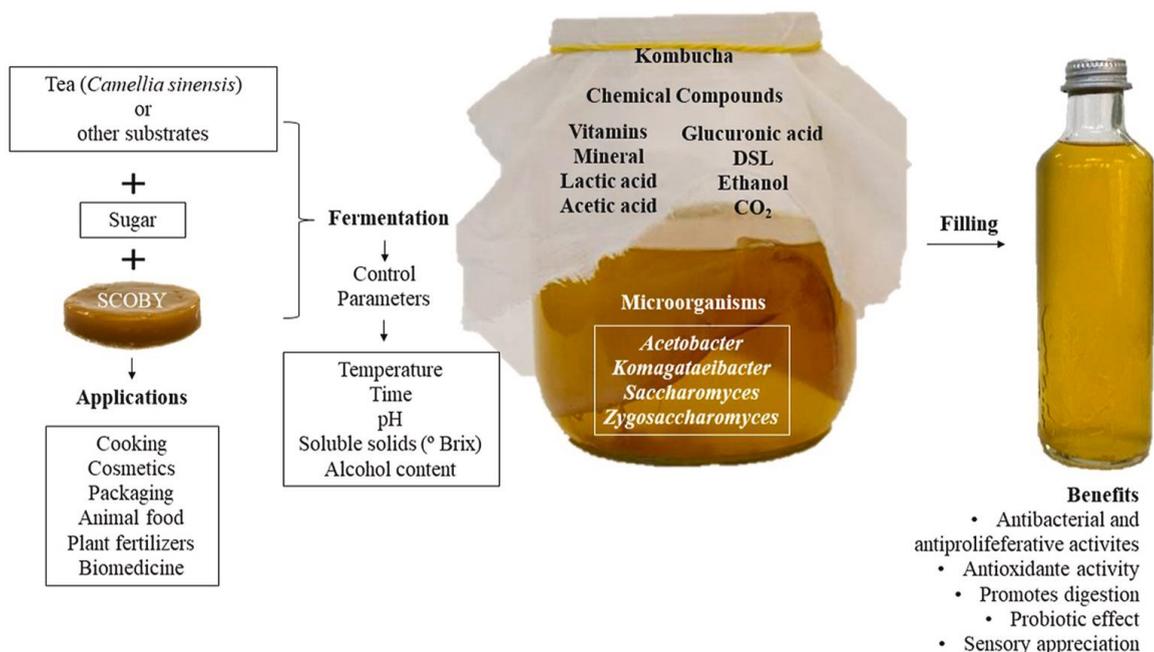


Figure 3 Fabrication et principaux effets santé attribués au kombucha (Coelho *et al.*, 2020).

Le SCOBY a une composition complexe et est constitué de :

- Levures (*Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycoides*, *Shizosaccharomyces*, *Torulasporea* et *Zygosaccharomyces*). Elles sont capables d'hydrolyser le saccharose

en glucose et fructose par l'intermédiaire d'un catalyseur enzymatique de type invertase, de produire l'éthanol via une voie glycolytique et de libérer du dioxyde de carbone (Chakravorty *et al.*, 2016; Coton *et al.*, 2017; Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

- BA (*Komagataeibacter*, *Acetobacter*, et *Gluconacetobacter*), qui convertissent l'éthanol en acide acétique par oxydation, à l'aide des enzymes alcool déshydrogénases et aldéhyde déshydrogénases. Elles convertissent aussi le glucose en acide gluconique et glucuronique (MartínezLeal *et al.*, 2018). L'espèce *K. xylinus* est responsable de la biosynthèse de la pellicule de cellulose, support des microorganismes, en utilisant le saccharose comme source de carbone (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).
- BL et genres apparentés, ont également été détectés, en moindre abondance: *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Ruminococcaceae*, *Bifidobacterium*, *Thermus* et *Propionibacterium* (Santos, 2016). Ces bactéries produisent d'autres acides organiques (citrique, malique et tartrique).

Une approche métabolomique a montré que plusieurs esters sont associés au développement de *H. valbyensis*, tandis que les alcools sont associés aux levures et aux BA, l'acide acétique à *A. indonesiensis*, et les acides gras saturés à tous les microorganismes présents. La concentration en métabolites dépend de l'activité microbienne, la composition en levures, et la phase de production. Si la composition microbienne reste le facteur principal dans l'évaluation sensorielle, le type de thé a également un rôle majeur. Enfin, l'association de *B. bruxellensis* et *A. indonesiensis* apporte des caractères organoleptiques spécifiques du jus de pomme (Tran *et al.*, 2022).

1 - 3 - 3 Les kéfirs

Le kéfir bénéficie de plusieurs appellations : kefir en Asie centrale, ou kephir/ kiaphur/ kefer/ knapon/ kepi/ kippi dans la région des Balkans et du Caucase. Il peut être confectionné à partir de lait (MK) ou bien à partir de solutions aqueuses sucrées et fruitées (kéfirs d'eau ou WK) (Guzel-Seydim *et al.*, 2021; Lynch *et al.*, 2021).

Bien que les deux types de kéfirs abritent la même communauté symbiotique de levures, des BL et des BA, les boissons diffèrent de par leur composition et l'abondance des entités présentes (Martínez-Torres *et al.*, 2017), ce qui affecte les caractéristiques du produit final.

Les MK comprennent des Lactobacilles, qui utilisent les sous-produits du lait comme substrats pour la fermentation et la production d'un glucogalactane, ou kéfiran, produit par *Lactobacillus kefiranofaciens*. Les lactobacilles dans les WK (*L. hilgardii* par exemple) utilisent le saccharose comme substrat et produisent le dextran. L'aspect des grains obtenus diffère selon les deux types de kéfir (Fig. 4).

Des productions de MK ont été menées en initiant la fermentation soit en présence de grains issus de MK ou de WK, et vice versa. Les travaux montrent que les grains ne sont pas interchangeables pour une fermentation optimale (Syrokou et al., 2019).



Figure 4 Aspect des grains de kéfir d'eau et de lait (Guzel-Seydim et al, 2021)

Les principales différences entre les kéfirs de lait et d'eau sont rassemblées ci-après.

Tableau V Différences entre le Kéfir de lait et le Kéfir d'eau (d'après Magalhães et al., 2010; Karina et al., 2018)

Caractéristiques	Kéfir de lait	Kéfir d'eau
Matrice utilisée	Lait (vache, chèvre, lait végétal)	Solution aqueuse sucrée et fruitée (à base d'eau)
Diversité de substrats Pouvant être fermentés	Plus faible	Plus grande variété (fruits secs et frais, légumes, céréales, épices peuvent être ajoutés).
Aspect des grains	Petits granules discrets Opaque couleur blanche à crème Ressemblent à des fleurons de chou-fleur ou à du pop-corn, structure semi-rigide	Petits, de forme granuleuse Translucides et de couleur gris-blanc Ressemblant à du "sel gemme" Cireux et de consistance dure
Diamètre des grains	0,1 à 2,0 cm	Variés (de quelques mm à quelques cm)
Influence du substrat sur La couleur du grain	Non	Oui (ex : la couleur des fruits)
Composition chimique	86 % d'eau ; 14 % de matière sèche ; 58 % de polysaccharides ; 30 % de protéines ; 7% de matières grasses ; 5 % de cendres.	Composition moyenne peu connue : 10 à 14 % de matière sèche ; 8-10 % (p/v) de saccharose
Microorganismes		
Bactéries	<i>Lactococcus</i> SP dominants. Les bactéries acétiques sont moins répandues.	<i>Lactococcus</i> SP : rare ; Bactéries acétiques : plus répandues ; Prédominance de <i>Lb. paracasei</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. kefiri</i> et <i>Lactococcus lactis</i>
Levures	<i>Candida spp</i> ; <i>Saccharomyces sp</i> est minoritaire.	<i>Candida</i> SP sont rarement trouvées. <i>Saccharomyces</i> SP sont dominants.
Principal polysaccharide dans les grains & producteurs	kéfiran <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kefirgranum</i> et <i>L. parakefir</i> produisent des EPS	α -glucanes ou dextrans <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. nagelii</i> , <i>L. hordei</i> et <i>L. hilgardii</i> responsables de la génération de la structure de dextran
Restriction de consommation.	Ne convient pas aux consommateurs végétaliens ou intolérants au lactose.	Convient aux consommateurs végétaliens ou intolérants au lactose.
Réutilisation des grains	Les grains (WK et MK) sont récupérables après la fin de la fermentation et peuvent être réutilisés pour la prochaine production de kéfir.	

La production artisanale de kéfir d'eau nécessite de l'eau, du saccharose comme source de carbone et/ou une variété de fruits frais et secs, légumes et céréales comme source d'azote et de vitamines (figues séchées, raisins secs, citron, ananas, banane, pomme, grenade, tomate, carotte, riz et/ou des épices comme le gingembre). Les grains de kéfir représentent environ 10% de volume final (p/v) de la boisson. La fermentation spontanée s'effectue en 24 h à 25-30 °C, dans des conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose, selon le degré de fermeture du contenant. Cette fermentation se termine lorsque l'acidité de boisson atteint le degré souhaité (pH 4,5 ±1). Les boissons pétillantes obtenues sont conservées à 4°C afin de bloquer l'activité microbienne (Garofalo *et al.*, 2020). A fin de chaque cycle, les grains sont recyclés et réutilisés à l'infini dans des fermentations successives par back-slopping. Les étapes-clés sont rassemblées **Figure 5**.



Figure 5 Étapes de la fabrication traditionnelle du kéfir de figue (adapté de Corona *et al.*, 2016; Lynch *et al.*, 2021)

D'un point de vue microbiologique, les entités bactériennes les plus représentées sont les Lactobacilles (10^8 UFC/g), dont *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ainsi que les deux espèces *Lb. hilgardii* et *Lb. nagelii*. Ces dernières produisent des exopolysaccharides (EPS de type α -glucanes) qui sont les agents structurants des grains. Des spécificités géographiques existent pour *Lb. hordei*

et *Lb. satsumensis* (Allemagne, Brésil), *Lb. harbinensis* (exclusivement sur grains de kéfir isolés en Belgique), *Lb. buchneri* et *Lb. kefir* (exclusivement sur grains isolés au Brésil). Le genre *Leuconostoc* est aussi couramment détecté, et englobe les espèces *L. mesenteroides*, *L. citreum* (Galli *et al.*, 1995; Gulitz *et al.*, 2011), et *Leuc. pseudomesenteroides* (Laureys *et al.*, 2019). Plus récemment, la présence de Bifidobactéries, *B. psychraerophilum*, *B. aquikefiri* et *B. tibiigranuli* a été rapportée (Gulitz *et al.*, 2013; Laureys *et al.*, 2016, 2018a; Laureys et De Vuyst, 2017; Verce *et al.*, 2019; Eckel *et al.*, 2020).

La composition du kéfir d'eau en levures est dominée par l'espèce *S. cerevisiae* (10^6 à 10^7 UFC/g) (Laureys et De Vuyst, 2014 ; Zanirati *et al.*, 2015; Verce *et al.*, 2019) et les membres du genre *Dekkera* (*Brettanomyces*). Les espèces *Zygotorulaspota* et *Torulaspota pretoriensi* ont été identifiées dans le kéfir d'eau en France, Italie, Royaume-Uni et États-Unis (Pidoux, 1989; Galli *et al.*, 1995; Marsh *et al.*, 2013). Les levures hydrolysent le saccharose en glucose et fructose via une β -D-fructofuranosidase extracellulaire (invertase), et rendent ces sucres simples disponibles pour les bactéries du consortium par diffusion facilitée (Reed et Nagodawithana, 1991; Watson, 1993). Ces levures utilisent ces monosaccharides pour leur métabolisme et produisent de l'éthanol et de dioxyde de carbone via la voie glycolytique (Russell *et al* Stewart, 2022).

Selon les conditions de fermentation, les BA sont présentes à des concentrations de 10^6 à 10^8 UFC/g. Il s'agit principalement des espèces du genre *Acetobacter* (*A. lovaniensis* et *A. fabarum* (Stadie *et al.*, 2013) et *Gluconobacter* (Marsh *et al.*, 2013).

La maîtrise du processus de fermentation à l'échelle industrielle exige le contrôle de plusieurs facteurs, qui affectent la qualité finale de la boisson et le taux de croissance des grains (Moretti *et al.*, 2022b) (Fig. 6). Le type de fruit et sa méthode de préparation peuvent contribuer à la présence des micro-organismes potentiellement indésirables comme les Enterobacteriaceae et/ou *Pseudomonas* (Randazzo *et al.*, 2016). L'effet de l'oxygène agit sur la concentration et la diversité des BA. Les fermentations industrielles étant réalisées essentiellement en présence d'oxygène, les BA y sont abondantes, avec notamment les espèces suivantes : *Gluconobacter roseus*, *G. oxydans*, *Acetobacter donesiensis* et *A. fabarum*. Leur prolifération entraîne des concentrations élevées d'acide acétique, une chute massive de pH, et un stress acide important vis à vis des autres micro-organismes. Tous ces éléments sont accompagnés d'une

diminution progressive de la croissance des grains au cours de la période de rétrogradation.

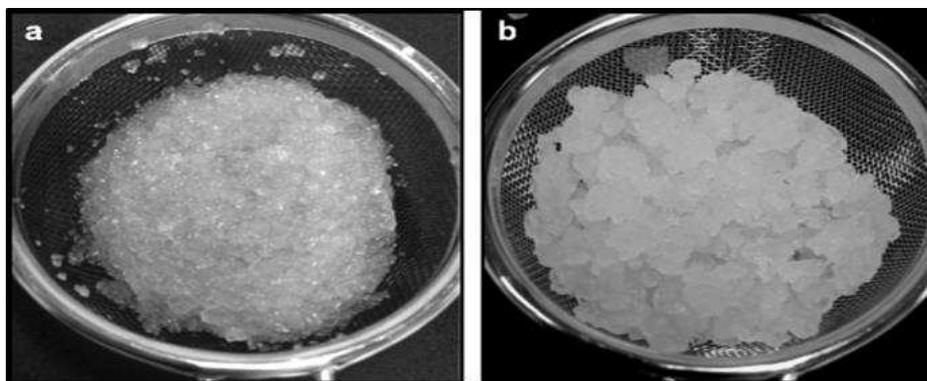


Figure 6 Grains de kéfir d'eau obtenus en procédés industriel (a) et domestique (b) (Laureys *et al.*, 2017).

En absence d'oxygène, la prolifération des bactéries est corrélée à des concentrations plus élevées d'acétate d'éthyle, qui confère au produit une odeur caractéristique fruitée (Laureys *et al.*, 2018). La source et la concentration en nutriments sont liées à l'apport de fruits. Selon Lynch *et al.*, (2021), des solutions pauvres en nutriments ralentissent la fermentation, ce qui résulte en une faible production de métabolites et de CO₂, des concentrations en sucres résiduels et un pH élevés.

A contrario, l'ajout de nutriments, comme les figues, favorise la croissance des levures (*S. cerevisiae*), des BL (*Lb. nagelii*) et des BA, ce qui limite le ratio d'acide acétique par rapport à l'acide lactique et à l'éthanol (Gulitz *et al.*, 2011). Le taux de calcium apporté par le fruit a également un impact sur le pH de la solution et sur la croissance de la masse des grains. Une eau dure, contenant une teneur plus élevée en ions calcium et magnésium, est plus adaptée aux fermentations de kéfir d'eau. Porchet, dès 1934, compare l'apport de différents fruits et légumes (raisin, raisins secs, dattes, prunes séchées, figues séchées, figues fraîches, bananes, abricots, pommes, pommes de terre et carottes) (Porchet, 1934). Il note la supériorité des figues séchées. Sur une durée de 18 jours, la présence de ces fruits entraîne une augmentation de la masse des grains de 70 % contre 1 à 4 % avec les autres fruits. Il a été proposé que les figues contiennent un facteur de croissance extractible à l'eau froide, et modérément stable à la chaleur, et que l'effet positif des figues soit également lié à sa teneur élevée en calcium (162 mg/100 g) (Reiß, 1990).

Des cultures commerciales sous forme lyophilisée sont aujourd'hui disponibles (« kefir d'aquafaidate », BioNova snc, Villanova sull'Arda, Italie). Selon le fabricant, elles contiennent

un mélange de 109 UFC/g de Lactobacilles (*Lactobacillus fermentum*, *Lb. kefir*), de lactocoques (*Lactococcus lactis*), de Leuconostokes (*Leuconostoc mesenteroides*), et de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Corona *et al.*, 2016; Randazzo *et al.*, 2016).

// Les bactéries lactiques, des acteurs majeurs des aliments fermentés

II - 1 Généralités

Le groupe des bactéries lactiques (BL) rassemble des coques et des bacilles à Gram positive, non sporulés et dépourvus d'activité catalase. Les BL sont aérobies-anaérobies facultatives et tolèrent les pH acides. Elles sont généralement immobiles, et seules quelques espèces sont motiles (George *et al.*, 2018). Au niveau cultural, les bactéries sont auxotrophes pour de nombreux acides aminés (18-21) et vitamines. Elles présentent une diversité de métabolismes mais partagent la caractéristique de produire majoritairement de l'acide lactique (au moins 50%) à partir du substrat carboné qui leur est fourni (Fig. 7).

Deux voies métaboliques distinctes peuvent être utilisées pour métaboliser les hexoses. Les espèces homofermentaires empruntent la voie de la glycolyse ou voie de Embden-Meyerhof.

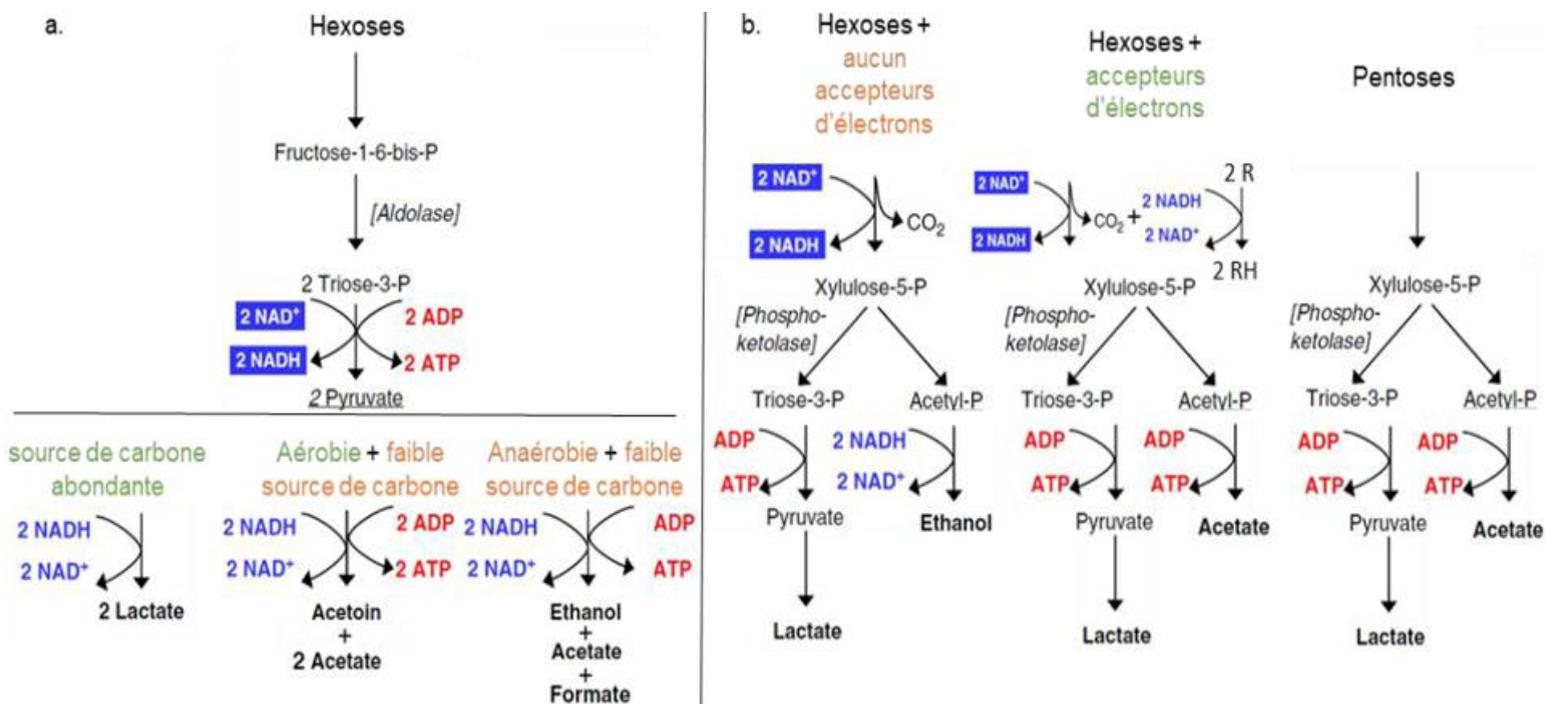


Figure 7 Métabolismes carbonés des bactéries lactiques (Harlé, 2020 ; adapté de Gänzle, 2015). **a**, Métabolisme des hexoses par la voie de Embden-Meyerhof ou glycolyse. La fermentation est homofermentaire en présence d'une source de carbone abondante. En cas contraire, elle sera mixte en aérobie ou en anaérobie. **b**, Métabolisme hétérofermentaire par la voie de la phosphokétolase. Les voies d'utilisation des hexoses diffèrent selon la présence ou l'absence d'accepteurs d'électrons. La voie dite des pentoses phosphates. NAD+: Nicotinamide adénine dinucléotide, ADP: Adénosine diphosphate.

Chaque mole d'hexose est réduite en 2 moles de trioses-3-phosphates, puis converties en 2 moles de pyruvate, ce qui produit 2 moles d'ATP (Fig. 7a). Les BL fermentent ensuite le pyruvate selon les conditions de fermentation. Lorsque la source de carbone est abondante, les 2 moles de pyruvate produites seront métabolisées en 2 moles de lactate sans production d'ATP supplémentaire. Lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate, le métabolisme est dit homolactique. En cas contraire (lorsque la source de carbone est limitante pour la croissance), certaines BL sont capables d'utiliser la voie homofermentaire en diversifiant les métabolites produits. Le processus est qualifié de fermentation mixte.

D'autres espèces sont dites hétérofermentaires strictes, c'est-à-dire qu'elles produisent systématiquement d'autres métabolites que l'acide lactique, à savoir du CO₂, de l'acide acétique et parfois de l'éthanol (Fig. 7b). La voie hétérofermentaire permet de produire 1 mole d'ATP, 1 mole de CO₂, 1 mole de lactate et soit 1 mole d'éthanol par mole d'hexose en absence d'accepteur d'électrons, soit 1 mole d'acétate par mole d'hexose en présence d'accepteur d'électrons (Fig. 7b). Le début de la voie est identique à celui de la fermentation homolactique. Puis le glucose-6-phosphate emprunte la voie oxydative de la voie des pentoses phosphates, qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Une seule enzyme est spécifique à la voie hétérofermentaire. Il s'agit de la phosphokétolase qui convertit le ribulose-5-phosphate en glyceraldehyde-3-phosphate et acétyl-phosphate. L'utilisation d'accepteurs d'électrons peut permettre à certaines BL comme *O. oeni* de convertir l'acétyl-phosphate en acétate plutôt qu'en éthanol (Unden *et al.*, 2017)

Les BL sont présentes dans de nombreux milieux naturels : lacs, sols, animaux et plantes. Des concentrations de l'ordre de 10² à 10⁴ UFC/g sont fréquemment associées aux surfaces des feuilles, fruits, légumes, graines de céréales et substances en décomposition. Les BL font également partie des flores endophytes. Elles sont par ailleurs présentes dans le lait et sont associées à l'écosystème pulmonaire et aux surfaces mucoales des animaux (intestins, colon, et sphère vaginale) (George *et al.*, 2018). Selon une méta-analyse de 9445 métagénomés issus du tractus gastro-intestinal (TGI) de l'humain, environ 30 espèces de BL ont une prévalence supérieure à 0.1% et leur abondance dépend du style d'alimentation (« western » vs « non western ») (Pasolli *et al.*, 2020). Les deux espèces les plus fréquentes dans le TGI humain sont *S. thermophilus* et *Lc. lactis*, et la proximité phylogénétique des souches avec celles présentes dans les métagénomés d'aliments fermentés suggèrent la colonisation primaire du TGI humain par des bactéries de l'alimentation (Pasolli *et al.*, 2020).

Plus récemment, l'abondance et la diversité des BL ont été également démontrées dans le TGI des insectes, comme les abeilles, bourdons, drosophiles et bombyx (Alawamleh *et al.*, 2021; Mathialagan *et al.*, 2018; Krams *et al.*, 2022).

II - 2 Taxonomie des BL

Les BL appartiennent à un seul ordre de bactéries à Gram positif nommé *Lactobacillales*, qui est placé dans le phylum des Firmicutes. Jusque 2020, il était divisé en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*, et plus de 60 genres.

Les approches de taxonomie moléculaire mises en œuvre par Zheng *et al.* (2020) ont largement remanié la famille des *Lactobacillaceae*, qui était constituée des trois genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Paralactobacillus*. Les découvertes progressives de plus de 270 espèces dans les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* exigeaient une nouvelle répartition plus équilibrée. Un grand nombre d'espèces ont été affiliées à 23 nouveaux genres: *Acetilactobacillus*, *Agriactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, et *Secundilactobacillus*. En 2022, l'étude de BL isolées à partir d'abeilles en Australie a permis de proposer un 24^{ème} genre, nommé *Nicolia* (*N. spurrieriana* sp. nov.) (Oliphant *et al.*, 2022).

Parallèlement, les familles *Lactobacillaceae* et *Leuconostocaceae* ont été réunies (Zheng *et al.*, 2020). Auparavant, la famille des *Leuconostocaceae* comprenait cinq genres, nommés *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*. Leur taxonomie bénéficie d'un important dynamisme, qui est illustré par le récent transfert de plusieurs espèces du genre *Weissella* dans un nouveau genre, nommé *Periweissella* (Bello *et al.*, 2022).

Une attention particulière est actuellement portée au sous-groupe (non phylogénétique) des BL dites « fructose-loving » (ou FLAB), qui sont affiliées aux genres *Fructobacillus* et *Apilactobacillus* (Endo *et al.*, 2018; Maeno *et al.*, 2021). Leurs membres sont associés aux niches riches en D-fructose, comme les fleurs, les fruits, les fruits fermentés dont le café (Junqueira

et al., 2022), et le TGI des insectes (Maeno *et al.*, 2021). Les FLAB préfèrent le fructose au glucose. Leur croissance sur glucose est donc retardée par rapport à celle sur fructose. La croissance sur glucose peut toutefois être stimulée si le milieu est supplémenté en pyruvate, en fructose, ou si l'incubation se fait en conditions aérobies. Ceci se traduit en milieu solide par une augmentation de la taille des colonies (Endo *et al.*, 2018). Les FLAB « obligatoires » sont hétérofermentaires et produisent du CO₂, de l'acétate et peu d'éthanol. En effet, les espèces sont caractérisées par une délétion du gène *adhE*. Elles n'ont donc pas de fonction ADH (alcool deshydrogénase), ni ALDH (acétaldéhyde deshydrogénase). Ceci génère un déséquilibre pour maintenir le ratio NAD/NADH. La présence d'accepteurs d'électrons externes est alors nécessaire pour régénérer le NADH : fructose (réduit en mannitol), pyruvate, O₂, ou encore de manière moins efficace les acides phénoliques comme l'acide coumarique (Filannino *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les FLAB ont perdu de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme carboné, et sont par exemple incapables d'utiliser le galactose ou le mannose. Ceci les différencie des autres espèces épiphytes comme *L. plantarum*, *L. sakei*, ou *Lc. spp*, qui ont gardé et souvent élargi leur pool de gènes dédié à l'utilisation des sucres. Cette adaptation se reflète dans la taille réduite du génome des FLAB (1,42 Mbp pour *Apilactobacillus micheneri* contre 3,5 Mbp pour *L. plantarum*). Aujourd'hui, les FLAB ont un intérêt dans le secteur alimentaire pour la fermentation de céréales (avoine), de fruits riches en pectine (pommes), ou encore de fèves de soja et de pois (Filannino *et al.*, 2019; Sedó Molina *et al.*, 2022).

II - 3 Concepts GRAS et QPS

Quelques cas d'infections par des streptocoques pathogènes et des entérocoques sont rapportés. Les entérocoques sont des pathogènes opportunistes, classés dans le groupe de risque 2 selon la Directive européenne 93/88.

Dans leur globalité, les BL bénéficient des statuts GRAS (Generally Recognized As Safe) attribués par les autorités de sécurité des aliments américaine (FDA, Food and Drug Administration). Un ensemble de 50 espèces sont classées QPS (Qualitative Presumption of Safety) par l'EFSA (European Food Safety Authority) en date du 25 juillet 2022 (<https://zenodo.org/badge/DOI/10.5281>).

II - 4 Les apports bénéfiques des BL dans l'alimentation

Les BL modifient la **texture et les propriétés rhéologiques des aliments**. A titre d'exemple, les BL produisent notamment des EPS. Ainsi, le dextran est un homopolymère produit par des espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* en milieu riche en saccharose. Outre un effet sur la texture, le dextran est largement utilisé en industrie alimentaire pour augmenter la viscosité et le volume des aliments, la rétention d'humidité et empêcher la cristallisation. La présence d'EPS a également un impact dans les fermentations à base de végétaux en modulant la gélification des protéines de soja et les caractéristiques rhéologiques des gels (Gustaw *et al.*, 2021).

Le métabolisme des BL produit de nombreux composés volatiles ou non, qui confèrent les **propriétés sensorielles particulières aux produits**. Ainsi dans le lait, l'acide citrique est l'un des principaux précurseurs de la formation de composés aromatiques comme l'acétate, l'acétoïne et le diacétyle. L'ensemble des molécules volatiles associées au yaourt sont présentées Fig. 8.

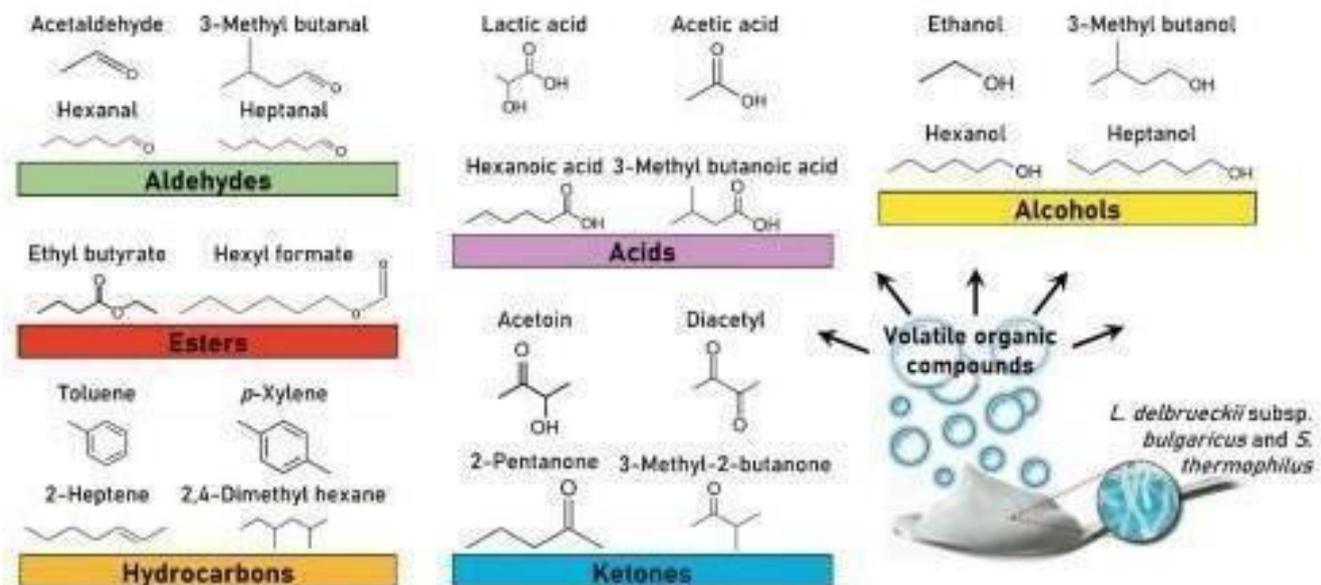


Figure 8 Classes de composés volatiles dans le yaourt après fermentation du lait par (Farag *et al.*, 2021).

Les BL assurent une **production efficace de métabolites antimicrobiens, anti-viraux et anti-fongiques**. Les plus connus sont le peroxyde d'hydrogène et l'acide lactique. D'autres composés sont également décrits comme des substances de bas poids moléculaire (diacétyle, acides gras, reuterin, reutericycline), des composés anti-fongiques (3-phényl-lactate, 2-

hydroxyisocaproate, propionate, hydroxyphenyl lactate) ainsi que trois classes de peptides antimicrobiens (RiPP, Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides ; bactériocines de classes II et III). L'effet létal des peptides antimicrobiens est obtenu *via* l'inhibition de la synthèse de la paroi ou la perturbation de la membrane par formation de pores. L'action antimicrobienne de bactériocines de classe II a été montrée *in vivo* en modèle souris. Ainsi l'ingestion de la souche *L. salivarius* UCC118 protège l'animal d'une infection par *L. monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007). Leur usage permettrait de moduler la composition du microbiote du TGI, et participerait à la lutte contre les pathogènes émergents résistants aux antibiotiques (George *et al.*, 2018).

Les ajouts de nisine et de pédiocine PA-1 purifiées dans les aliments sont autorisés dans l'industrie alimentaire et ils participent à limiter les flores d'altérations ou inhibent les flores pathogènes comme *Listeria monocytogenes*. La nisine est aujourd'hui utilisée comme additif dans plus de 50 pays, en particulier dans les productions laitières et les aliments en conserve. Une autre alternative est d'utiliser *in situ* des souches productrices d'activités antimicrobiennes (cultures de bioprotection).

Les BL ont des **propriétés de détoxification**. C'est le cas de souches isolées de Kimchi, qui sont capables de détoxifier des composés pesticides (chlorpyrifos, parathion) grâce à une hydrolase spécifique. L'utilisation d'une souche de l'espèce *L. rhamnosus* a permis de réduire l'absorption et latoxicité ultérieure de pesticides organophosphates et néonicotinoïdes chez la drosophile (George *et al.*, 2018).

Les BL assurent **de nombreuses synthèses et bioconversions** pendant la fermentation et les concentrations de nombreuses molécules sont augmentées : acides organiques comme l'acide lactique, acides gras à chaîne courte, vitamines (acide folique, riboflavine, Vit. C, pyridoxal, cobalamine ...), peptides bio-actifs ... La fermentation de plusieurs matrices végétales (olives, quinoaou farine de graines de Chia) entraîne une augmentation de la teneur en composés polyphénoliques. Ceci peut avoir des effets bénéfiques sur l'hypertension, et apporter des propriétés anti-oxydantes. Les espèces *Lev. brevis* et *Lev. zymae* produisent de l'acide γ -Aminobutyrique (GABA), qui agit comme inhibiteur de la neurotransmission dans le système nerveux central (Lee *et al.*, 2021). Enfin, la présence de FODMAPs (oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides et polyols fermentescibles) contribue au syndrome IBS

(Irritable bowel syndrome). Certaines BL, comme les FLAB, peuvent limiter leur présence dans les aliments (Yan *et al.*, 2018).

Les BL, et particulièrement les Lactobacilles, ont des **propriétés anti-inflammatoires, et des propriétés métaboliques** bénéfiques pour la sante de l'animal et de l'humain. Les interventions sur le microbiote sont réalisées *via* l'ingestion de BL concentrées et stabilisées (probiotiques) et/ou inactivées. Les dialogues établis avec les microbiotes résidents des animaux et leur système immunitaire montrent des effets potentiels de formulations contenant des probiotiques et/ou des prébiotiques sur la santé de l'homme (Binda *et al.*, 2020). Les objectifs visent à traiter l'obésité et les désordres métaboliques associés, et potentiellement d'autres maladies (Fig. 9).

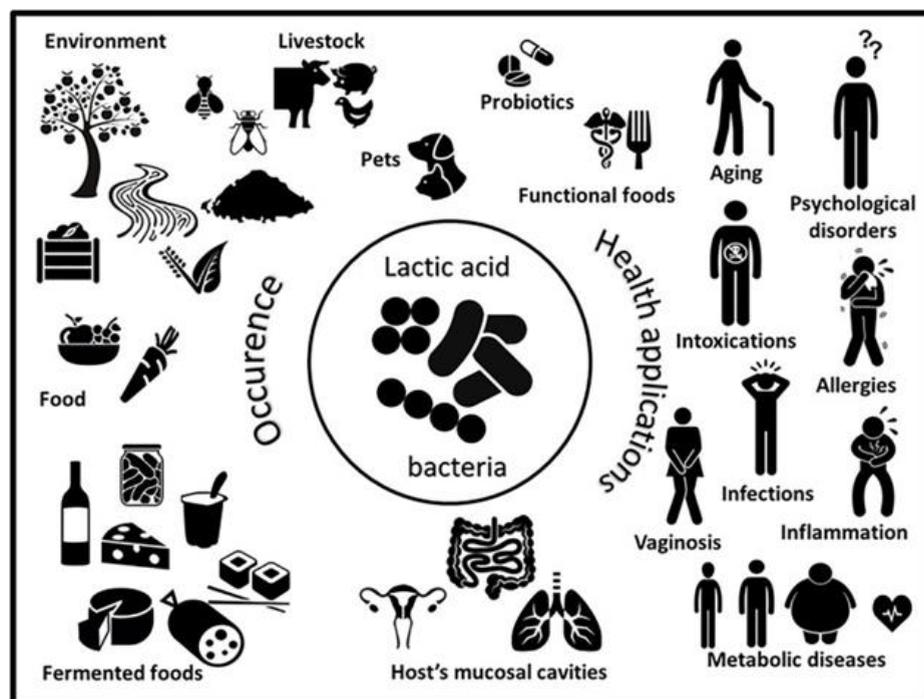


Figure 9 Représentation schématique de la prévalence des BL (gauche) et des applications dans le domaine de la santé (droite) (George *et al.*, 2018)

II - 5 Les BL et l'altération des aliments

Dans le secteur des boissons, les BL sont à l'origine d'altérations de nombreux produits comme les bières artisanales et les vins. La source des défauts est variable, et peut être liée à la synthèse d'amines biogènes, ou encore de composés épaississants comme les β -glucanes capsulaires. Ces derniers sont synthétisés à partir d'UDP-glucose, *via* la glycosyltransférase

GTF-2, ancrée à la membrane (Jakob *et al.*, 2021). L'altération aromatique des boissons par les BL implique également d'autres composés comme la 2-éthyltetrahydropyridine, la 2-acetyl-1-pyrroline, et la 2-acetyltetrahydropyridine qui sont associés au « goût de souris » dans le vin. Leur biosynthèse a été démontrée chez la BL *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176 (Costello *et al* Henschke, 2002). Dans le cidre, d'autres défauts sont liés à la dégradation du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde par la BL *Sec. collinoides* (Claisse et Lonvaud-Funel, 2001), la piqure acétique par les BA (Qin *et al.*, 2022), ou encore une forte production d'éthanol par *Zymomonas mobilis* à des pH supérieurs à 3,7 (maladie du « framboisé ») (Coton *et al.*, 2006). Des phénomènes similaires sont rencontrés dans les fermentations carnées et laitières. L'espèce *Leuconostoc mesenteroides* est souvent associée aux altérations des viandes et volailles et est responsable de l'acidification, de la production de gaz et d'EPS non désirés (George *et al.*, 2018).

II - 6 Les effets des BL résultent d'interactions avec d'autres entités

L'impact des BL est souvent lié à la synthèse de molécules en monoculture. Ces capacités peuvent toutefois être modulées *via* l'existence d'interactions (positives ou négatives) entre souches dans l'aliment. Les interactions positives peuvent être de type commensalisme, de coopération, de mutualisme et de syntrophie. Leur compréhension est améliorée grâce à l'apport d'approches de métabolomique. Ces interactions peuvent s'exercer entre les différentes souches incorporées dans les cultures commerciales complexes, et/ou entre les cultures commerciales inoculées et le microbiote indigène. Elles font partie des critères à prendre en compte lors de la sélection. Selon Canon *et al.* (2022), leur compréhension plus fine est un levier pour l'évolution des cultures commerciales, dans le secteur de l'alimentation et également dans d'autres domaines (Fig. 10).

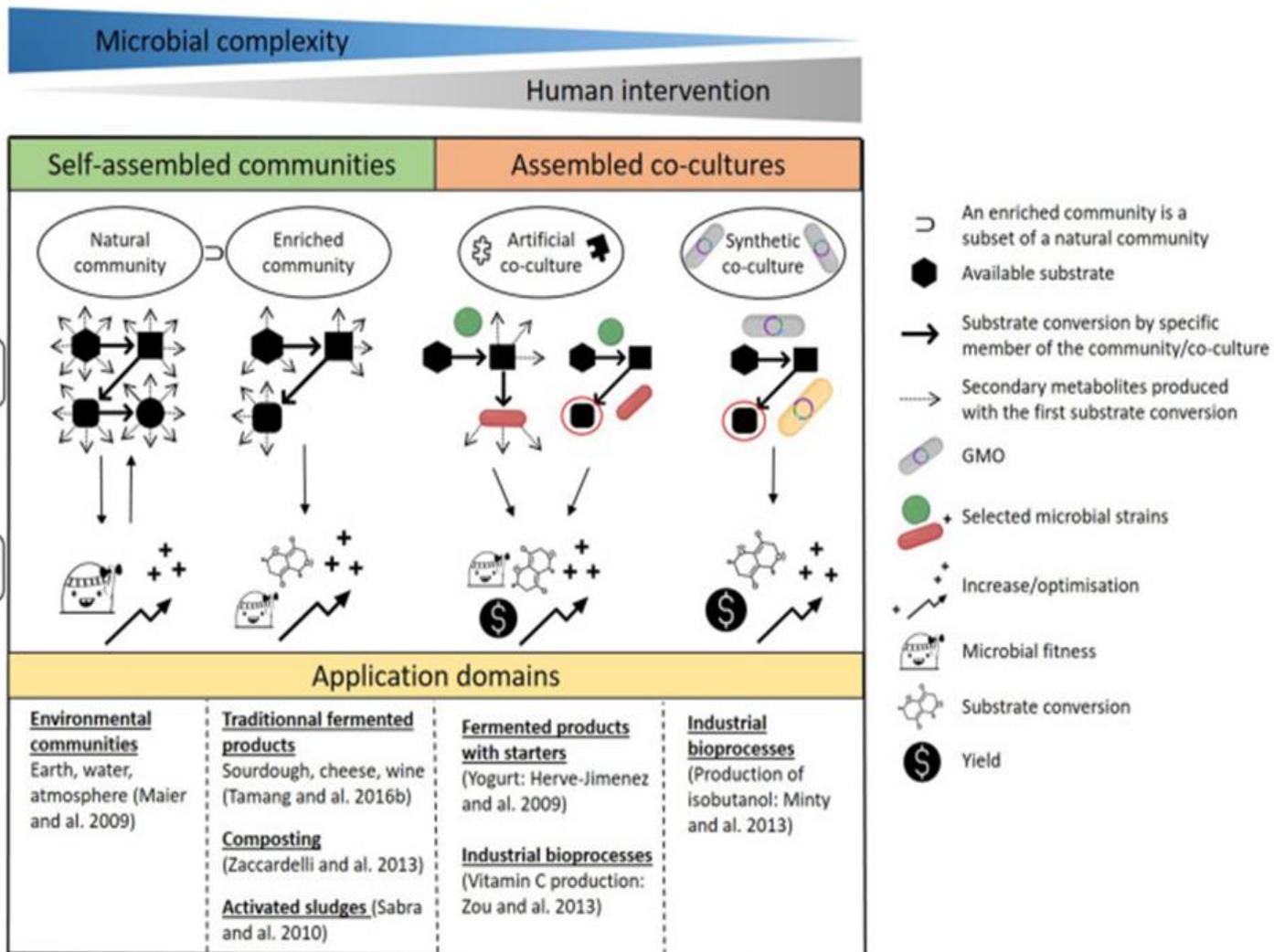


Figure 10 Les types de communautés microbiennes et de co-cultures, leur utilisation, bénéfiques et quelques exemples d'application. Communauté naturelle : communauté indigène ; communauté naturelle enrichie, communauté naturelle où une sélection de bactéries spécifiques s'est opérée ; Co-culture artificielle, association de microorganismes non trouvés nécessairement dans le nature ; co-culture synthétique, association de microorganismes dans laquelle au moins une souche est un OGM (Canon et al., 2020)

III Les bactéries associées au genre *Oenococcus* et leurs habitats

III - 1 *O. oeni* est affiliée aux vins et au cidre

L'espèce bactérienne responsable de la FML a tout d'abord été nommée *Bacterium gracile* (Muller-Thurgau et al Osterwalder, 1913), puis *Leuconostoc gracile* (Bidan, 1956). Dans les années qui ont suivi, la bactérie a été successivement classée dans différentes espèces du genre *Leuconostoc*. La révision détaillée du genre a été réalisée par Garvie (Garvie, 1967), menant à la description de 6 espèces, dont *L. oenos*. Cette espèce se distinguait notamment des autres espèces du genre *Leuconostoc* par son aptitude à utiliser le lactose, le saccharose et le maltose, et sa croissance à pH 4,8 en présence de 10 % (v/v) d'éthanol. Plus tard, Dicks et al., (1995) observent (i) des divergences entre les espèces au niveau des séquences codant les

ARN16S et (ii) un nombre plus faible d'opérons ribosomiques chez *L. oenos* (n=2) par rapport aux autres *Leuconostocaceae* (n=9) (Makarova *et al.*, 2006). En conséquence, *L. oenos* est séparée des autres *Leuconostoc*. L'espèce devient *Oenococcus oeni*, espèce unique dans le nouveau genre *Oenococcus*.

Yang *et al* Woese (1989) émettent l'hypothèse d'une évolution accélérée du groupe des *Leuconostoc* en général, et de l'espèce *O. oeni* en particulier, par rapport aux autres BL. Cette divergence serait liée à l'adaptation progressive de l'espèce aux conditions du vin, et à son isolement progressif dans cette niche, selon un phénomène de domestication. Ce terme traduit le processus par lequel des espèces évoluent du fait de leurs interactions avec les humains et s'adaptent ainsi aux niches agro-écologiques humaines. On note par exemple chez *O. oeni* la perte *a priori* systématique des voies de biosynthèse de l'arginine et de la proline, deux acides aminés parmi les plus abondants dans le moût de raisin. Cette adaptation très spécifique au milieu du vin est également visible dans la taille du génome d'*O. oeni* (environ 1,8 Mbp), plus faible que celle des génomes des autres BL (Makarova *et al.*, 2006).

L'espèce *O. oeni* rassemble des coques ellipsoïdes, de taille 0,2 µm à 1 µm, associés en paires. L'observation ultérieure des cellules en cytométrie de flux confirmera ce critère, ainsi que la formation de courtes chaînettes (Bartle *et al.*, 2019). Les souches sont hétérofermentaires et leur croissance est optimale entre pH 4,8 et 5,5 en présence de températures de 25°C à 30°C. Les bactéries sont multi-auxotrophes et leur croissance est donc fastidieuse. Elle est néanmoins stimulée en présence de jus de raisin ou de tomates. De même, l'ajout de fructose et de manganèse favorise l'obtention de biomasse. Les souches tolèrent les conditions acides (parfois inférieures à pH 3 +/- 0,5) et une concentration de 12 à 15 % vol/vol en éthanol (Grandvalet, 2017).

Une littérature abondante a décrit la présence de souches dans les vins et moûts issus de *Vitis vinifera* (Garvie, 1967; Dicks *et al.*, 1995; Lonvaud-Funel, 1999). L'isolement de bactéries à partir des baies de raisins est plus rare car leur concentration y est faible. D'autre part, les mécanismes qui gouvernent la transition des bactéries de l'état adhérent sur la surface de la baie vers des conditions de culture en laboratoire sont mal connus. La bactérie est connue par ailleurs pour son aptitude à former des biofilms sur la paroi des barriques en chêne, où elle peut survivre quelques mois (Bastard *et al.*, 2016). L'adhésion et la résistance en biofilms sont facilitées par la production d'exopolysaccharides (Gosset *et al.*, 2022).

Dès que les baies sont écrasées, la population de *O. oeni* augmente et reste stable autour de

10³ UFC/ml pendant la fermentation alcoolique, menée par *Saccharomyces cerevisiae*. La tolérance de *O. oeni* aux conditions acides et à la forte teneur en alcool permet à cette BL de survivre, alors que les autres espèces bactériennes indigènes sont contre-sélectionnées à ce stade. Lorsque la population indigène atteint la concentration de 10⁶ UFC/ml, la FML démarre. La dominance de *O. oeni* à cette étape est illustrée dans une étude métagénomique (barcoding) de vins issus de grappes de Barbera, où plus de 89% des souches bactériennes présentes en fin de FML appartiennent à l'espèce *O. oeni* (Cerutti *et al.*, 2019). L'accès au typage moléculaire des souches de *O. oeni* par VNTR suggère qu'un consortium de souches (1 à 11) est responsable de la FML. Il est sélectionné tout au long de la vinification et les compositions relatives entre souches évoluent (Larisika *et al.*, 2008; Nisiotou *et al.*, 2015; El Khoury *et al.*, 2017; Chaïb *et al.*, 2022a).

La possibilité de contrôle de la FML par un mécanisme de quorum-sensing (QS) a été peu évaluée. Ce type de régulation repose sur la sécrétion de petites molécules-signal nommées autoinduceurs (AI) durant le développement cellulaire. Lorsque ces molécules atteignent un certain taux (le *quorum*), elles sont reconnues et déclenchent l'expression de gènes spécifiques propices à un comportement de groupe. Le QS renseigne sur la densité et la composition de populations bactériennes. Dans le monde bactérien, il a trait à des aspects biologiques variés, mais liés à des conditions environnementales spécifiques, telles que la virulence, la production de biofilm et de bactériocines, la sporulation, la compétence ou encore la mobilité. L'architecture de base d'un système QS comporte un AI, une enzyme de synthèse d'AI et enfin un récepteur. Les AI sont de petites molécules de type acylhomosérines lactone (AHL) chez les bactéries Gram négatif correspondent à des petits peptides chez les bactéries Gram positives. Récemment, des auto-inducteurs dits de type 2 (AI2) ont été identifiés chez les deux types de bactéries. Ils sont donc considérés comme un langage universel des bactéries. Il a été observé que les génomes de nombreuses BL contiennent un gène *luxS*, qui est impliqué dans la conversion de S-ribosylhomocystéine (SRH) en 4,5-dihydroxy-2,3-pentanodione (DPD). Cette molécule est instable et génère, *via* des réarrangements, des composés à activité AI-2-like. La délétion de *luxS* chez quelques modèles de BL entraîne une baisse de leur capacité d'adhésion et de formation de biofilm (Johansen et Jespersen, 2017; Brexó de Souza Sant'Ana, 2018; Almeida *et al.*, 2020; Canon *et al.*, 2020). Chez *O. oeni*, bien que le gène *luxS* soit situé en amont du gène *mle*, aucune étude n'a évalué si la FML était sous le contrôle de QS.

La FML peut être conduite spontanément dans les vins à partir du microbiote indigène. La

biomasse nécessaire n'est cependant pas toujours obtenue. Aussi, des souches commerciales sont disponibles en fonction des types de vins, et ceci depuis 1983 (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Elles sont constituées d'une ou deux souches. Leur implantation permet un démarrage et un déroulement rapide de la FML. L'inoculation se fait à haute concentration (10^6 CFU/ml) pour favoriser l'implantation de la souche au sein de la flore indigène (qui est toujours présente) (Betteridge *et al.*, 2015 ; Bech-Terkilsen *et al.*, 2020). Les levains FML peuvent être inoculés après l'étape de FA (inoculation séquentielle), mais la co-inoculation avec les levains alcooliques est de plus en plus d'usage car elle permet généralement de réduire le temps de vinification. Il est présumé que les bactéries s'acclimatent progressivement et donc plus efficacement aux conditions difficiles qu'instaurent durant la FA (Bartowsky *et al.*, 2015).

La sélection de levains malolactiques se fait généralement à partir de FML spontanées se déroulant de façon optimale dans des vins aux conditions physico-chimiques difficiles. Les isolats sont criblés selon des critères de résistance aux stress inhérents à l'écosystème œnologique et sur des critères technologiques. Les avancées en termes de génomique fonctionnelle facilitent la caractérisation des souches en complément des approches physiologiques laborieuses (Fig. 11). Elles permettent par exemple de rechercher par simple PCR la présence de gènes liés à des activités délétères comme la production d'amines biogènes ou de polysaccharides filants (Werning *et al.*, 2006 ; Coton *et al.*, 2010).

La production de composés d'intérêt aromatique est recherchée (Lerm *et al.*, 2010 ; Betteridge *et al.*, 2015; Goode, 2018) (Fig. 11). Les gènes responsables sont variables dans l'espèce. De plus leur expression est modulée par l'état adhérent ou planctonique des cellules. Ainsi, les cellules détachées de biofilms ont une cinétique améliorée de dégradation de l'acide malique et un effet positif est observé sur la production des esters, des alcools, et des acides organiques (Bastard *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2019; Tofalo, 2021). Ceci oriente vers des nouvelles techniques de contrôle de la FML, en immobilisant les bactéries sur support.

Des approches d'amélioration de souches par évolution dirigée sont étudiées. Elles consistent en l'adaptation de souches à des conditions œnologiques drastiques par repiquages successifs en présence de stress (Betteridge *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2018).

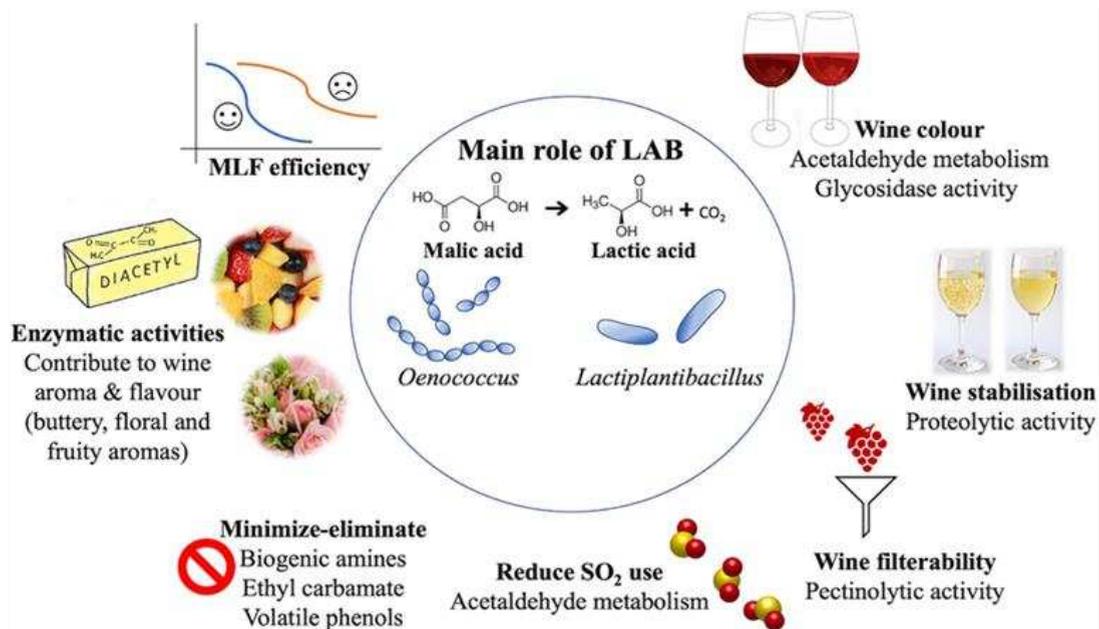


Figure 11 Les applications présentes et futures pour l'utilisation de BL dans la production de vins (adapté de [Virdis et al., 2021](#)).

III - 2 Les espèces du genre *Oenococcus* sont également associées à d'autres boissons et produits fermentés

De vastes campagnes d'isolement ont permis de collecter **des souches de *O. oeni*** à partir de vins rouges, de vins blancs, de champagnes, puis de cidre et de kombucha ([Iglesias et al., 2018](#); [Lorentzen et al., 2019](#)). Comme observé dans les vins, le déclenchement de FML par *O. oeni* dans le jus de pomme ou de mangue a une influence sur le potentiel aromatique du vin produit ([Varakumar et al., 2013](#)).

Environ 250 souches de *O. oeni* associées aux vins issus de raisins, de cidre et de kombucha ont été collectées à travers le monde et séquencées. **L'analyse phylogénétique montre l'existence de 4 phylgroupes distincts dans l'espèce (A à D)**. Les souches ne présentent pas de spécificité géographique mais des spécificités existent selon les types de vins ([Campbell-Sills et al., 2017](#); [El Khoury et al., 2017](#)). Le groupe A contient exclusivement des souches du vin, et les souches de vins blancs et rouges de Bourgogne sont affiliées à des sous-groupes spécifiques. Les groupes B et C réunissent des souches de cidre ou de vins et le groupe D rassemble quelques souches de kombucha isolées à l'UBO (Université de Bretagne Occidentale).

L'espèce *O. oeni* peut également coloniser des environnements autres, riches en fructose, contenant peu ou pas d'alcool. C'est le cas de fruits mûrs à coque ([Bridier et al., 2011](#)), d'olives ([Kavroulakis et Ntougias, 2011](#)), de pulpe de café ([Pothakos et al., 2020](#)) et du pain d'abeilles

([Mattila et al., 2012](#)). L'identification de ces isolats n'a toute fois pas été suivie du séquençage complet de leur génome. Plus récemment, des études métagénomiques de boissons fermentées ont permis la reconstitution de génomes dits MAG « *Metagenome-Assembled Genome* ». Ces approches montrent la présence de *O. oeni* dans les kéfirs d'eau, le kombucha, le vinaigre de cidre et des produits saumurés à base de graines de moutarde et de tomates séchées ([Leech et al., 2020](#)).

Plus de 10 ans après sa création, de nouvelles espèces ont progressivement enrichi le genre *Oenococcus*. L'espèce ***O. kitaharae*** a été proposée en 2006, et la souche type a été isolée au Japon à partir d'échantillons de shōchū, une eau-de-vie issue de riz, d'orge et de patate douce entre autres ([Endo et Okada, 2006](#)). L'étude de [Leech et al. \(2020\)](#) a également identifié des membres de cette espèce dans des MAGs issus de kéfirs d'eau et de kombucha. La souche type de l'espèce ***O. alcoholitolerans*** a quant à elle été identifiée à partir d'isolats issus de sucre de canne utilisés dans la production de bioéthanol au Brésil ([Badotti et al., 2014](#)). La présence de souches de *O. kitaharae* est également suspectée dans le kéfir ([Leech et al., 2020](#)). Enfin, des souches isolées de cidre ont été affiliées à l'espèce ***O. sicerae*** ([Cousin et al., 2019](#)). L'existence d'une cinquième espèce « *Candidatus Oenococcus aquikefiri* » a été proposée suite à l'exploration de kéfirs d'eau par métagénomique, et a finalement été replacée dans l'espèce *O. sicerae* après compléments d'analyses ([Verge et al., 2020](#)). Le génome de cette bactérie contient un gène code une dextransucrase, qui est susceptible de contribuer à la croissance des grains de kéfir.

III - 3 Signatures pour le genre *Oenococcus* et différences entre les espèces

A partir de 2015, le nombre croissant de génomes disponibles dans le genre *Oenococcus* a ouvert la voie vers les analyses de comparaisons génomiques.

Chez les Lactobacillaceae, **l'appartenance au genre *Oenococcus* est corrélée à un ensemble de signatures** dans le génome qui sont absentes chez les genres les plus proches (*Leuconostoc* et *Weissella*). Elles correspondent à des insertions-délétions (ou indels) modestes, et sont localisées dans les 13 protéines suivantes: RpoB (sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne); la translocase SecY (deux indels), la protéine ribosomale L13 associée à la sous-unité 50S, la chaperone moléculaire DnaK, la riboflavine kinase, un membre des familles de protéines Sua5/YciO/YrdC/YwIC, la pseudouridine synthase RluA, une perméase assurant le passage d'acides aminés, l'hydrolase TatD, une insertase de la famille YidC/Oxa1, une ARN

méthyltransférase SAM-dépendante, la GTPase HflX et enfin une phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transférase (Bello *et al.*, 2022).

Dans le genre *Oenococcus*, les génomes des souches types des quatre espèces décrites montrent une délétion des gènes *mutS/L*, conférant un **caractère hypermutateur aux souches**. Les taux de mutation spontanée sont 100 fois inférieurs chez les souches *L. mesenteroides* ATCC 8293 et *P. pentosaceus* ATCC 25745 (*mutSL* positives) par rapport à *O. oeni* PSU-1 (*mutSL* négative). Toutefois la souche-type de *O. kitaharae* présenterait un taux intermédiaire (Marcobal *et al.*, 2008).

Des divergences génomiques et fonctionnelles ont été recherchées entre souches d'espèces différentes et/ou entre souches de la même espèce mais provenant d'environnements différents.

- Chez *O. oeni*, l'analyse du génome de 226 souches révèle que le pangénome comporte plus de 9400 gènes tandis que le génome cœur est estimé à moins de 900 gènes, témoignant de la diversité génétique de l'espèce (Lorentzen *et al.*, 2019). Les différences observées entre souches soutiennent la notion de domestication des souches de vins et de cidre (Campbell-Sills *et al.*, 2015). Ces deux boissons partagent des contraintes similaires (acidité, éthanol, polyphénols, et disponibilités en sucres, malate, et citrate). Une différence réside toutefois dans les concentrations en éthanol qui excède rarement 6% dans les cidres, tandis qu'elles atteignent couramment 11–14% dans les vins. La domestication des souches au vin est corrélée à la présence d'activités cataboliques vis-à-vis du glucose, ribose, tréhalose, mannose, cellobiose, melibiose, maltose et arabinose chez les souches du phylogroupe A. Ces souches apparaissent plus spécialisées à ce niveau par rapport à celles des phylogroupes B et C. *A contrario*, ces dernières métabolisent le saccharose et le maltose ce qui leur permettrait une plus grande adaptation aux jus de fruits autres que le jus de raisin (Cibrario *et al.*, 2016).
- Les comparaisons entre espèces montrent que 62% des ORFs de *O. kitaharae* possèdent un homologue chez *O. oeni* PSU-1 (Borneman *et al.*, 2012). Toutefois, 483 ORFs montrent une homologie avec d'autres BL. La souche-type de *O. kitaharae* contient plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les défenses de la cellule (bactériocines, antimicrobiens, systèmes de restriction-modification et locus CRISPR)

qui sont absent chez *O. oeni*. Les deux génomes diffèrent également au niveau du répertoire de gènes associés à la synthèse d'acides aminés et l'utilisation des carbohydrates. Certaines sont visibles au niveau physiologique. Ainsi, *O. kitaharae* DSM17330^T est incapable de dégrader l'acide malique en acide lactique et CO₂, et ne dispose pas non plus de voie de dégradation du citrate. De ces premières observations, il est proposé que *O. kitaharae* évolue dans un environnement plus compétitif que *O. oeni*.

- Les éléments génétiques mobiles (MGE) sont connus pour leur participation à la diversité chez les BL et codent des traits d'adaptation aux différentes niches notamment chez les Lactobacillaceae (Davray *et al.*, 2021). L'espèce *O. oeni* est riche en MGE : plasmides (Fremaux *et al.*, 1993 ; Zavaleta *et al.*, 1997 ; Favier *et al.*, 2012), séquences d'insertion (Bon *et al.*, 2009 ; El Gharniti *et al.*, 2012) et prophages (Claisse *et al.*, 2021 ; Chaïb *et al.*, 2022).

Si *O. oeni* semble bien domestiquée dans le vin et le cidre, d'autres souches et espèces sont capables de coloniser des environnements différents. Il apparait d'autre part que plusieurs espèces co-existent dans le cidre et le kéfir et que chaque espèce dans le genre ne semble donc pas exclusivement associée à un type de boissons. L'isolement de nouvelles souches de boissons et aliments plus variés est une stratégie importante à l'avenir, pour (i) comprendre les bases de l'adaptation des oenocoques aux boissons fermentées, (ii) définir les modalités de spéciation au sein de ce genre peu exploré et (iii) ouvrir de nouvelles pistes d'utilisation des nouvelles souches isolées. L'application industrielle majeure des oenocoques reste aujourd'hui le développement de cultures malolactiques. Quelques applications non-œnologiques ont toutefois été proposées pour l'espèce *O. oeni*. L'observation de la tolérance des souches (acidité, présence d'éthanol et de composés phénoliques) a mené à l'évaluation de leur potentiel probiotique dans un modèle murin de colite induite chimiquement. La souche IOEB9115 a montré un taux de survie remarquable associé à un potentiel immunomodulateur (Foligné *et al.*, 2010). Plus récemment, les composés volatiles associés à des fermentats de *O. oeni* ont montré leur potentiel d'attraction pour le piégeage de drosophiles (Đurović *et al.*, 2021).

IV Les interactions hôtes-phages

IV - 1 Définitions

Les virus sont incapables de se multiplier par scission binaire et dépendent de la machinerie énergétique et traductionnelle de leur hôte. Leur multiplication se fait donc par auto-assemblage de leurs constituants. Ces caractéristiques en font des parasites intracellulaires obligatoires (Węgrzyn, 2022). Le monde des virus englobe des entités variées susceptibles d'infecter les Eucaryotes, les Eubactéries et les Archées. Le terme bactériophages (ou phages) a été réservé aux virus infectant les organismes procaryotes et le terme de virus d'Archées a été ensuite proposé (Clokic *et al.*, 2011; Abedon *et al.* Murray, 2013), limitant ainsi progressivement l'usage du terme bactériophages aux seuls virus infectant les Eubactéries.

La découverte des bactériophages est attribuée à Félix d'Hérelle en 1917 (Duckworth, 1976). Il s'agit d'entités filtrables, capables de lyser une culture bactérienne. Les recherches ultérieures ont montré que les phages sont présents et abondants dans tous les écosystèmes (eaux, sols, microbiotes animaux). Les stations d'épurations sont notamment des réservoirs très riches et une source reconnue des chercheurs. En 1999, la quantité de cellules procaryotes dans la biosphère est de $4-6 \times 10^{30}$ et les dénombrements directs de phages permettent d'estimer qu'ils sont 10 fois plus nombreux que les cellules dans les échantillons environnementaux (Hendrix, 1999). Les inventaires réalisés pendant les deux décennies suivantes confirment la quantité totale de 10^{31} sur la planète (Mushegian, 2020).

Les premières observations en microscopie électronique à transmission (MET) datent des années 1940 et mettent en évidence des particules dont la taille est de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Le matériel nucléaire correspond à de l'ADN (sb ou db) ou à de l'ARN (Fig. 12). Il est conditionné dans une capsid polyédrique (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* et *Cystoviridae*), d'aspect filamenteux (*Inoviridae*), pléomorphe (*Plasmaviridae*) ou connectée à une queue (*Caudovirales*). La capsid peut être entourée d'une membrane (*Tectiviridae*, *Cystoviridae*) ou ne contenir qu'une membrane et pas de capsid (*Plasmaviridae*) (Fig. 12). La plupart des phages observés en MET sont caudés et la proportion en 2018 était de 96,3% (Lefkowitz *et al.*, 2018). Leurs génomes sont constitués d'ADN, et la taille moyenne est de quelques dizaines de kb. Récemment, des phages dits « jumbo » ont été découverts. La taille de leur génome dépasse 200 kb, et peut atteindre plus de 700 kb (Devoto *et al.*, 2019 ; Al-Shayeb *et al.*, 2020).

Le succès récent des recherches de phages et de virus d'Archées dans de nouveaux écosystèmes ainsi que les nouvelles données issues de la métagénomique ont démultiplié le nombre de séquences virales accessibles en banque (Dion *et al.*, 2020). Dans son bilan de l'année 2022, l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) reconnaît un ensemble de 10 434 espèces de virus (Walker *et al.*, 2022).

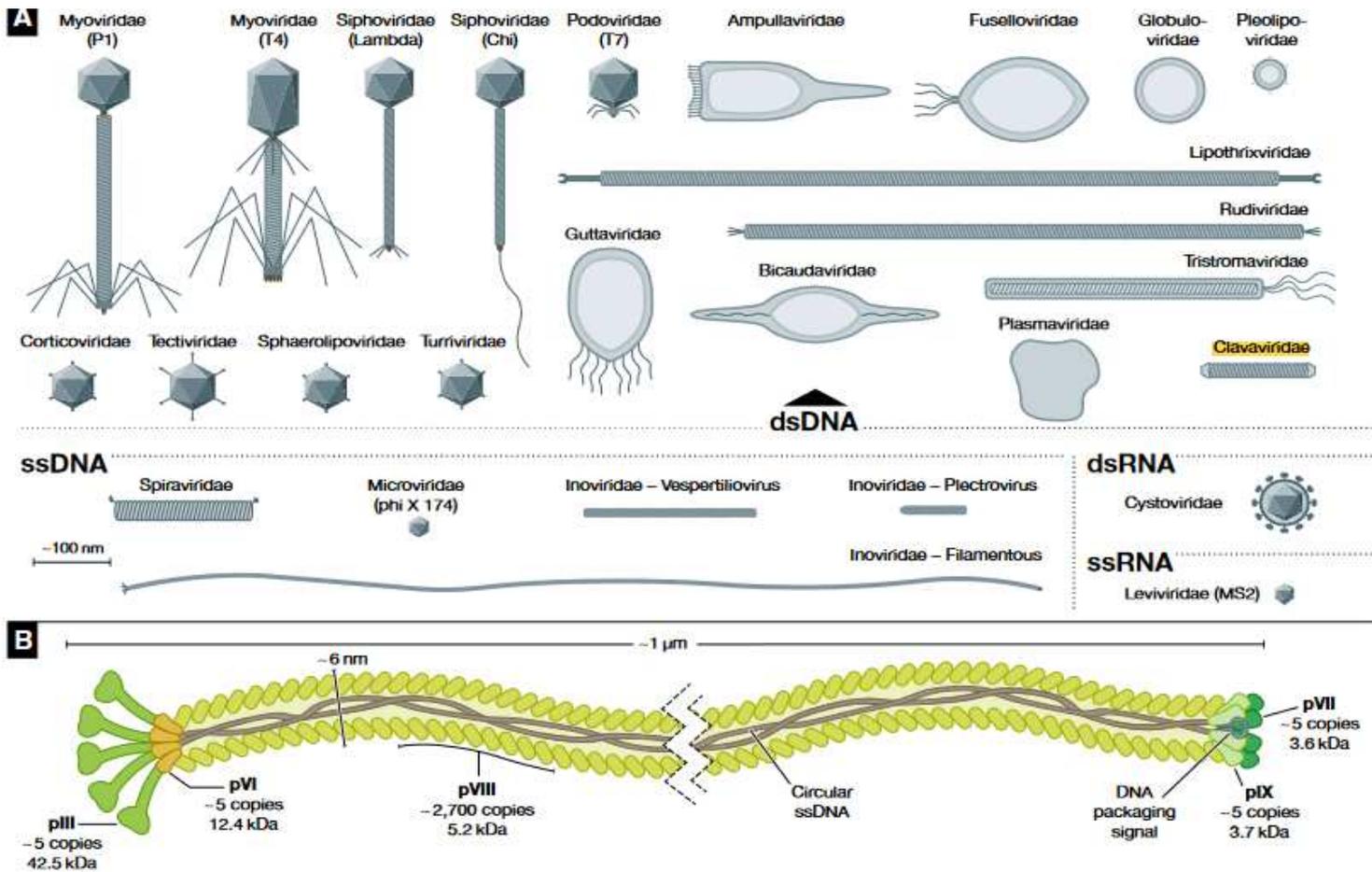


Figure 12 Principaux morphotypes de phages à ADN et à ARN (A) et détail de la morphologie des phages filamenteux (B) (d'après Hay et Lithgow, 2019).

En conséquence, l'ICTV a engagé un travail de méga-taxonomie des virus, et a décidé, dès 2020, d'ajouter des taxons supérieurs (Adriaenssens, 2021; Gilroy *et al.*, 2021). La diversité connue des phages et virus d'Archées a été répartie dans 4 super-règnes (« realms ») : *Duplodnaviria*, *Monodnaviria*, *Varidnaviria*, et *Riboviria*. Ils comprennent six règnes et sept phyla (Fig. 13).

Les **virus caudés** (qu'il s'agisse de phages ou de virus d'Archées) sont dans le super règne des *Duplodnaviria*, le règne des *Heunggongvirae*, le phylum *Uroviricota*, et la classe des *Caudoviricetes*. Dans cette classe, la situation est complexe car elle contient une quantité et une diversité importantes de virus (1197 genres et 3601 espèces, en août 2022, <http://ictv.global>) et d'importants remaniements sont en cours.

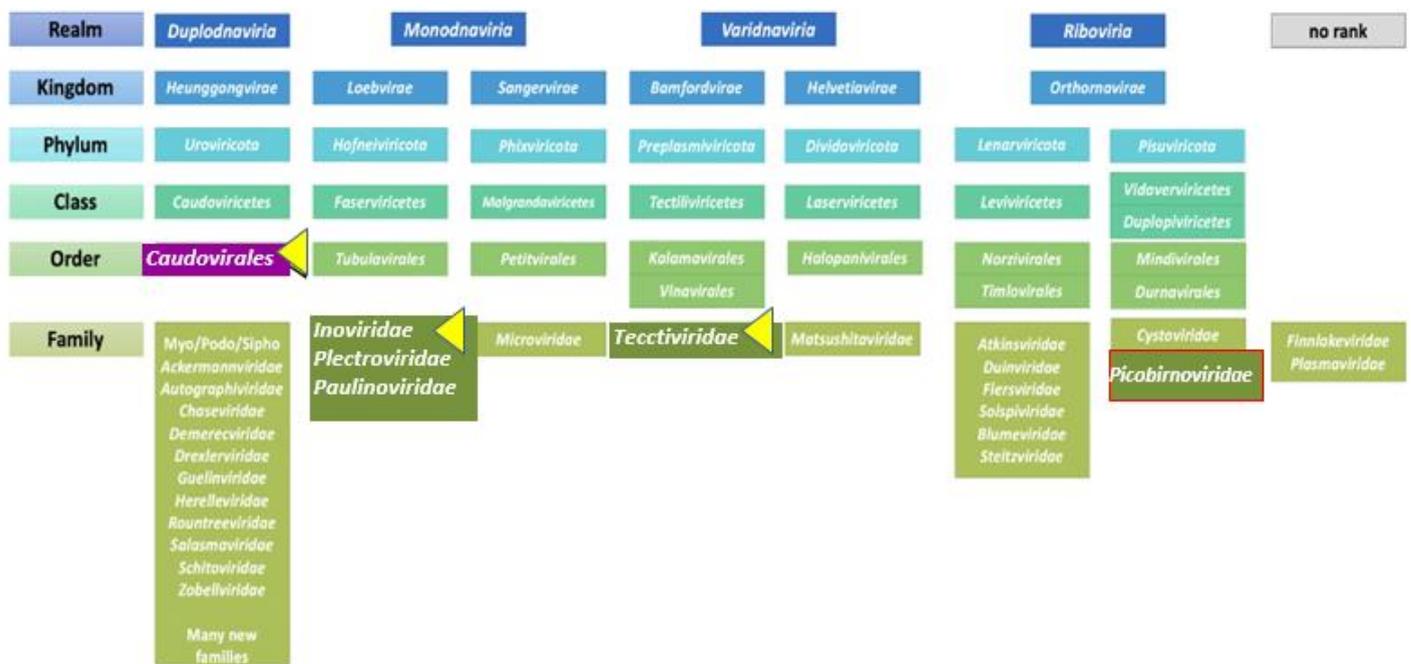


Figure 13 Nouvelle classification des virus proposée en 2020 par l'ICTV (Adriaenssens, 2021). Les ordres & familles de phages fréquemment associés aux aliments sont indiqués par un triangle jaune. Il s'agit des *Caudovirales* et des familles des *Inoviridae* et des *Tectiviridae*.

Dans la classe des *Caudoviricetes*, les virus d'Archées sont répartis dans trois ordres. Les phages caudés se retrouvent dans deux ordres, dont les *Crassvirales* qui contiennent les Crassphages, majoritaires dans les TGI des animaux. La majorité des phages caudés sont quant à eux affiliés à l'ordre des *Caudovirales* (Zinke *et al.*, 2022). Jusqu'en 2020, cet ordre des *Caudovirales* abritait trois familles historiques, à savoir les *Siphoviridae* (phages à longue queue non contractile), les *Podoviridae* (phages à queue courte) et les *Myoviridae* (phages à queue contractile). L'ordre et les trois familles sont toutefois appelés à disparaître (l'ordre n'apparaît plus sur le site de l'ICTV en novembre 2022) (Turner *et al.*, 2021). Leurs membres seront progressivement classés dans de nouvelles familles : *Ackermannviridae*, *Herelleviridae* ... en l'attente éventuelle d'un nouvel ordre. L'usage des termes *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Myoviridae* sera probablement conservé pour décrire les morphotypes de particules.

Les recommandations actuelles de l'ICTV sont de multiplier les outils d'analyse pour une meilleure classification des virus nouvellement isolés. Les démarcations pour créer une nouvelle espèce et un nouveau genre sont de 95% et 70% d'homologie nucléotidique, respectivement. L'appartenance aux mêmes familles implique le partage de même contenu protéique. Enfin, le recours aux arbres phylogénétiques basés sur les séquences des terminases ou des protéines de capsid reste essentiel pour les classifications dans les taxons supérieurs.

IV - 2 L'adhésion des phages caudés aux enveloppes des bactéries

L'infection commence par l'**adsorption** des phages sur des récepteurs situés à la surface des bactéries, et cette étape-clé est suivie de l'**injection de l'ADN** dans leur cytoplasme (Shen et Loessner, 2021).

La **capacité d'adhésion des phages caudés** est assurée par la RBP (Receptor Binding Protein), qui est située au sein d'une plaque basale, ou base plate, à l'extrémité de la queue. Comme représenté Fig. 14, plusieurs protéines sont impliquées dans cette architecture. Les gènes correspondants sont situés à proximité les uns des autres sur le génome viral.

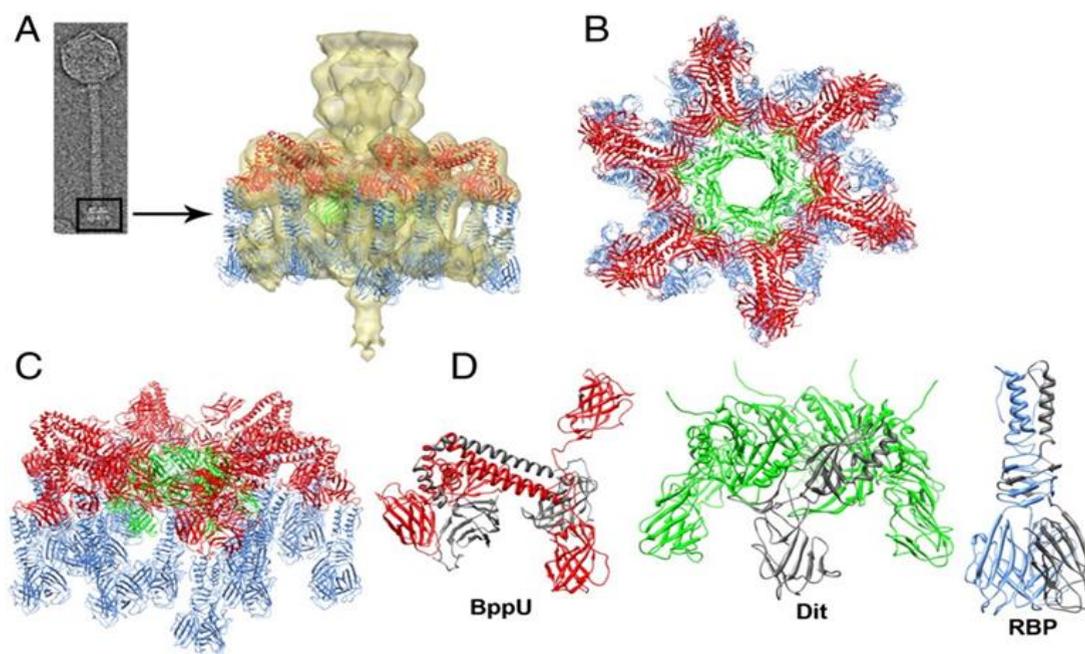


Figure 14 Représentation schématique de la structure de l'extrémité de la queue du phage TP901-1 (espèce P335) infectant la BL *Lactococcus lactis*. Les protéines représentées sont BppU (Baseplate protein), Dit (Distal Tail protein), et la RBP (Receptor Binding protein (Veesler *et al.*, 2012). Deux protéines supplémentaires sont nécessaires : BppL et Tal (Tail fiber).

L'extrémité de la queue de la particule va interagir avec **la surface de l'hôte**, où sont organisés différents types de glycanes. L'existence de capsules (CPS) autour des cellules, ou d'EPS relargués dans le milieu, est également rapportée chez les bactéries à Gram positive et négative. Chez les bactéries à Gram négative, les membranes externes contiennent le LPS, constitués d'un lipideconservé et d'une chaîne variable nommée O-antigène-polysaccharides (Fig. 15)

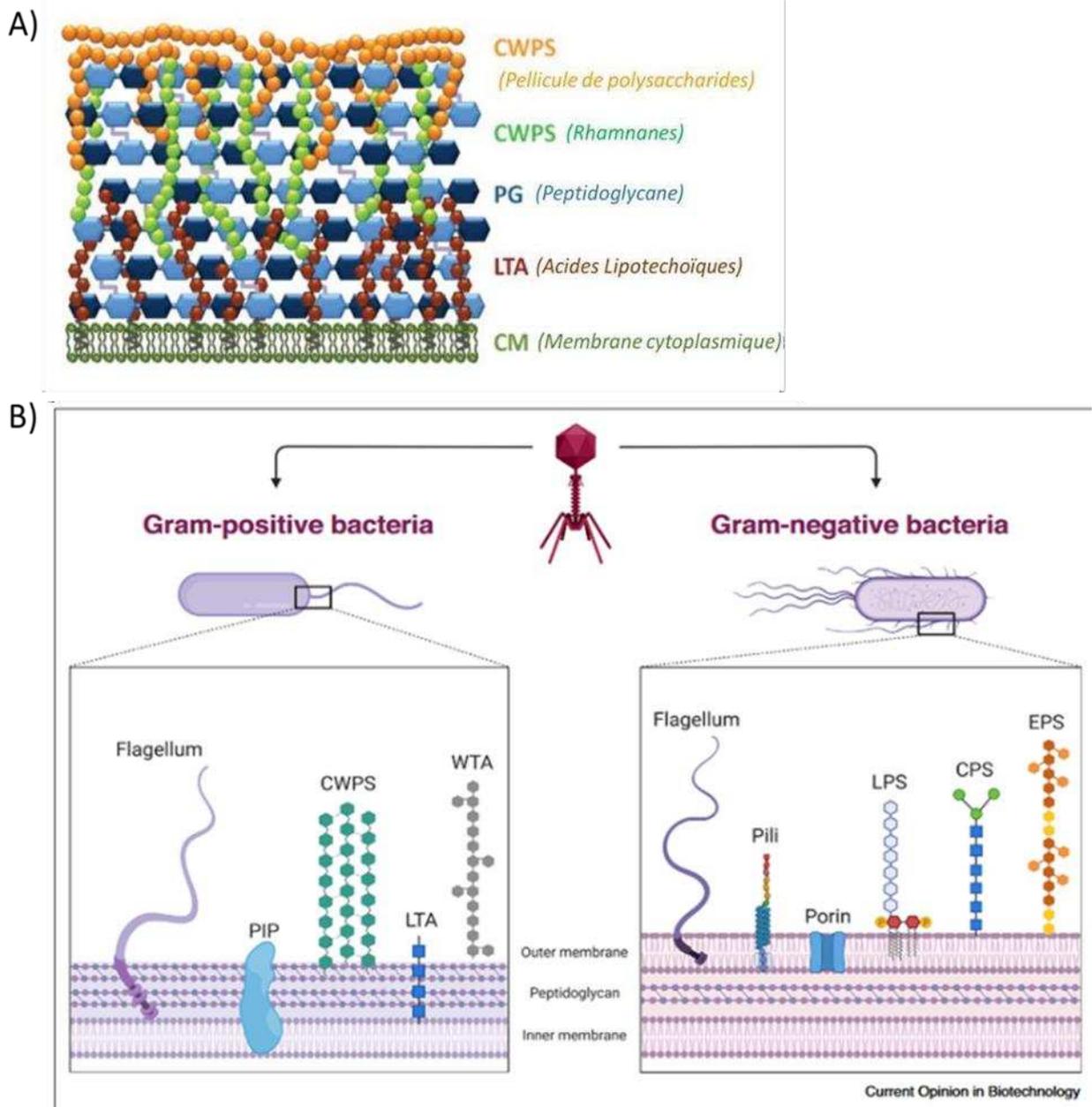


Figure 15 Enchevêtrement des structures de surface chez les bactéries à Gram positive (A), et représentation schématique des structures présentes sur l’enveloppe de bactéries à Gram-négative et Gram-positive reconnues par les phages (B). Les cercles, hexagones et carrés de couleur représentent différents sucres (d’après [Martínez et al., 2020](#); [Shen et Loessner, 2021](#)).

La paroi des bactéries à Gram positive est quant à elle particulièrement complexe et variable à l’instar d’un Rubik’s cube ([Mahony et al., 2020](#)). Outre le peptidoglycane (PG), les bactéries à Gram positive contiennent des acides teichoïques ancrés à la paroi (wall-teichoic acid ou WTA) ou à la membrane (acides lipotechoïques ou LTW) ([Guérin et al., 2022](#)). De plus, chez la BL *L. lactis*, les polysaccharides de paroi (cell wall polysaccharide ou CWPS) comportent un complexe impliqué dans le PG, non exposé à la surface et riche en rhamnane, nommé rhamnane, sur lequel est attaché de manière covalente une pellicule exposée à la surface

(PSP) (Fig. 15a). Le locus responsable de la synthèse du rhamnane et de la PSP sont réunis dans un même cluster de 20 à 30 kb, nommé *cpws* (Theodorou *et al.*, 2020). Les phages reconnaissent des structures très variables à la surface des bactéries. **Chez une bactérie à Gram négative**, les récepteurs peuvent être portés par les flagelles, des porines, les lipopolysaccharides (LPS), les capsules (CPS) et les EPS (Fig. 15b). **Chez les bactéries à Gram positive**, les récepteurs peuvent être de nature protéique, mais ils sont le plus souvent associés aux CWPS. Les phages de *L. lactis* ont une variété de RBP et chaque type reconnaît une architecture de CWPS distincte. Quatre génotypes (A-D) de paroi bactérienne ont été décrits. Les types A et B contiennent un rhamnane substitué par de courtes chaînes d'oligosaccharides. Les types C et D contiennent le rhamnane et une décoration de surface (pellicule, PSP). L'analyse des PSP chez six souches des groupes C et D montre différentes compositions : phosphohexasaccharides, pentasaccharides sans groupement phosphate, phosphopentasaccharides contenant de l'arabinitol, ou du ribitol. Un niveau supérieur de complexité est conféré par l'action de systèmes de glycosylation à trois composants, qui agissent sur le PSP, sur le rhamnane ou les LTA (Theodorou *et al.*, 2020; Rismondo *et al.*, 2021). Enfin, il est important de signaler que chez ces BL, l'adhésion du phage aux structures pariétales ne permet pas forcément l'infection. Pour certains phages, l'adsorption passe d'un état réversible à un état irréversible et entraîne l'injection, qui est donc concomitante. Chez d'autres phages, la primo- reconnaissance réversible des structures pariétales est suivie par la reconnaissance d'une protéine membranaire, de type PIP ou YjaE (Mooney *et al.*, 2006), essentielle à l'injection ultérieure de l'ADN viral dans le cytoplasme (Fig. 15).

IV - 3 Les cycles lytiques et lysogéniques chez les phages caudés

Les phages appartenant à l'ordre des *Caudovirales* peuvent être séparés en deux grandes catégories selon leur comportement dans la bactérie infectée, une fois l'adhésion et l'injection réalisées avec succès. Ils sont qualifiés de phages virulents ou de phages tempérés.

IV - 3 - 1 Les phages virulents

Après l'adsorption et l'injection du matériel nucléaire dans les cellules, l'expression de gènes précoces spécifiques initie le cycle lytique. Le phage détourne la machinerie cellulaire pour assurer la réplication de son génome et l'expression de ses gènes. Une procapside vide est

d'abord formée. L'une des extrémités contient un pore d'entrée de l'ADN, formé par la protéine portale. Une terminase forme avec la protéine portale un moteur moléculaire puissant, qui utilise de l'ATP pour transporter l'ADN viral à l'intérieur de la procapside. Cela est suivi de la fermeture de la portale par des protéines formant le site d'attachement de la queue. Ce complexe forme une capsid mature extrêmement stable capable de résister à une pression interne créée par une forte compaction d'ADN double brin. L'assemblage s'achève par une fixation du connecteur de la capsid et des protéines terminales de la queue. Cette structure caudale porte à son extrémité un complexe basal constitué de protéines de la liaison aux récepteurs de l'enveloppe bactérienne (Aksyuk et Rossmann, 2011). La formation des néovirions dans le cytoplasme est accompagnée de la lyse bactérienne et la libération de particules nouvellement formées (par hydrolyse membranaire sous l'effet d'endolysines phagiques) (Fig. 16). Cette étape est réalisée grâce à l'endolysine. Chez les phages infectant les bactéries Gram positive, cette enzyme est souvent une muramidase ou une amidase. L'endolysine dite canonique est libérée dans le compartiment pariétal de la couche de peptidoglycane à travers des pores formés par des oligomères de protéines appelées holines (Young, 2014). Les virions sont libérés dans l'environnement et peuvent immédiatement commencer un cycle d'infection sur de nouveaux hôtes (Fig. 16).

Les expériences d'Ellis et Delbrück ont permis de décrire les différentes phases de l'infection (Ellis et Delbrück, 1939) : période d'adsorption (temps nécessaire pour l'adsorption de plus 80% de phages sur leur hôte *in vitro*) ; la période de latence (temps entre l'adsorption du phage et la libération de nouvelles particules par lyse bactérienne) puis la lyse. La notion de burst size définit la quantité de virions libérés par cellule infectée. Ces paramètres permettent de caractériser le niveau de virulence d'un phage particulier. Ils dépendent également de l'état physiologique de la cellule et de paramètres environnementaux tels que la température (Sillankorva *et al.*, 2004).

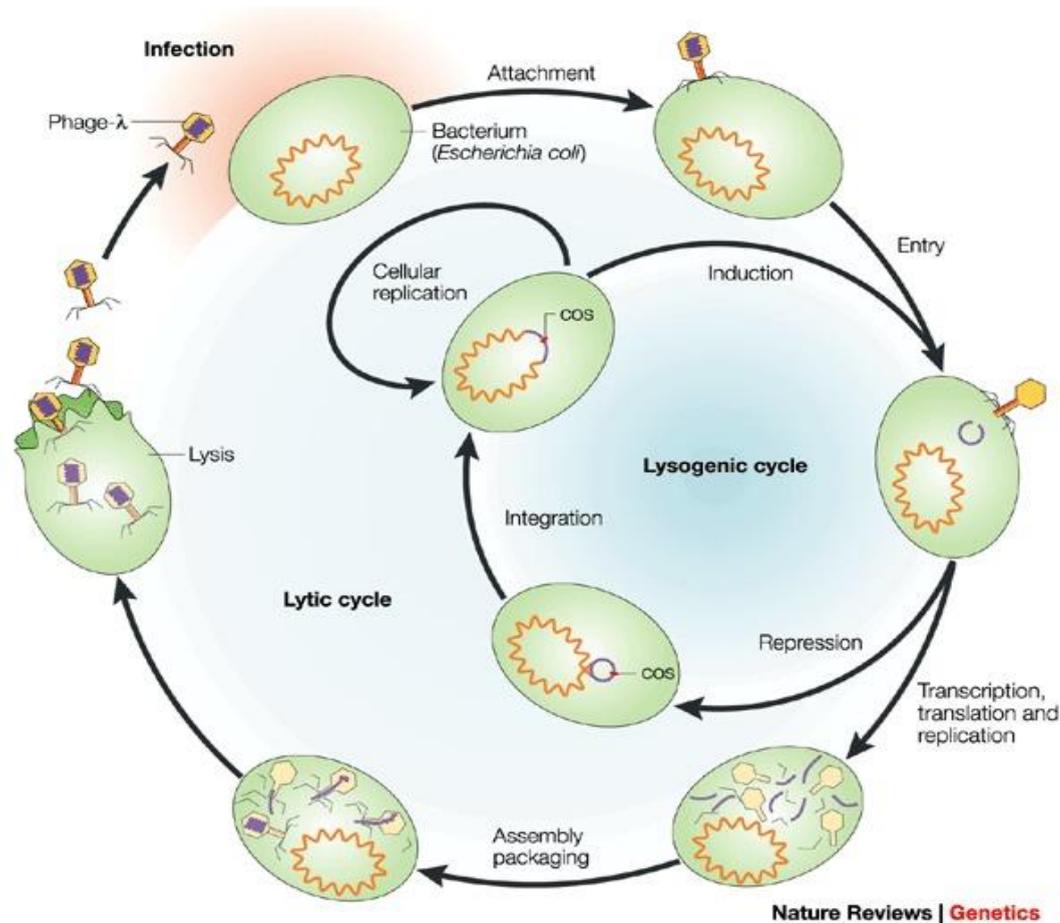


Figure 16 Représentation schématique des cycles lytiques et lysogéniques (Campbell, 2003).

La caractérisation de l'activité lytique d'un phage implique également de déterminer le nombre de souches infectées (spectre d'hôte). Selon les environnements, les phages sont spécifiques d'une ou quelques souche(s) (spécialistes) ou ont un spectre plus large (généralistes). Dans ce dernier cas, le spectre peut notamment inclure des souches de plusieurs espèces dans un même genre, comme démontré chez les staphylocoques (Göller *et al.*, 2021). Enfin, une étude récente montre chez les *Vibrionaceae* que le spectre et la virulence des phages sont indépendants de leur morphotype (Sipho-, Podo- ou Myo-virus) (Kauffman *et al.*, 2022).

IV - 3 - 2 Les phages tempérés

Le début du cycle des phages tempérés est similaire à celui des phages lytiques. L'ADN viral injecté aura toutefois une autre trajectoire dans la cellule. Sa réplication et l'expression des gènes ne se produit pas car l'ADN va aller s'intégrer en un point spécifique du génome bactérien. Le génome intégré sera qualifié de prophage (Fig. 16). L'intégration requiert l'action de l'enzyme phagique nommée "intégrase" qui assure la recombinaison site spécifique (RSS) entre deux séquences identiques sur le génome viral (*attP*), et bactérien (*attB*). La

recombinase phagique appartient aux groupes des intégrases à tyrosine ou à sérine. Une même souche peut porter plusieurs prophages, comme *E. coli* O157:H7 str. Sakai, qui en porte 18, ce qui constitue 16% de la taille du génome ([Asadulghani et al., 2009](#)). L'insertion d'un même phage en tandem en un même site a été également rapportée pour différents phages, dont λ et P2 ([Basso et al., 2020](#)).

L'état lysogène est considéré comme une longue période de latence pendant laquelle les prophages sont dormants et se répliquent uniquement avec l'hôte. Ceci est rendu possible par la répression de l'expression des gènes prophagiques, qui s'exerce grâce au répresseur phagique. La signature des phages tempérés correspond à la présence d'un module de lysogénie, qui comprend un site *attP* et des gènes codant l'intégrase et les régulateurs de la lysogénie (dont le répresseur). Des mutations (au niveau de l'intégrase ou des régulateurs) peuvent entraîner la perte de la capacité à assurer la RSS. Le phage sera qualifié d'ex-tempéré. *A contrario*, les génomes des phages virulents sont dépourvus de module de lysogénie.

Dans les faits, chez de nombreuses bactéries, la répression n'est pas parfaitement maintenue et des particules sont produites spontanément en culture (induction spontanée ou SPI) ([Dimmock et al., 2015](#)). Chez *E. coli*, le taux d'excision spontané de Lambda est de l'ordre de 10^{-6} par division cellulaire en conditions non stressantes ([Ball et Johnson, 1991](#)).

Une induction massive du prophage peut se produire, mettant fin au cycle lysogénique. Cela se traduit par l'excision du génome viral, une bascule vers un cycle lytique, la mort de la population illustrée par une lyse, et la production de (néo)virions ([Fig. 16](#)). Au laboratoire, plusieurs composés chimiques (UV, antibiotiques, H_2O_2 et autres espèces réactives de l'oxygène) peuvent induire l'induction de prophages lorsqu'ils sont ajoutés dans des cultures de bactéries lysogènes. La présence de ces molécules inductrices génère des lésions de l'ADN. En réponse, le système de réparation SOS est activé. Chez le couple *E. coli*/ λ , la protéine RecA est activée et conduit au clivage du répresseur CI. En conséquence, la concentration de CI va drastiquement diminuer dans la cellule, ce qui à terme active le cycle lytique de Lambda ([Refardt, 2011](#)). *In vivo*, les informations sur la nature des inducteurs sont plus limitées. Chez la bactérie *L. jensenii*, présente dans le tractus vaginal, un détergent non ionique, le nonoxinol-9, utilisé comme spermicide, induit l'excision du prophage défectif Lv1 ([Martín et al., 2010](#)). Plus récemment, il a été montré chez un modèle murin que l'apport de fructose et d'acides gras à courtes chaînes dans l'alimentation induit l'excision de prophages chez la BL *L. reuteri* 6475 ([Oh et al., 2019](#)).

Des cas de répressions croisées existent entre différents prophages, comme démontré chez *Enterococcus faecalis* (Matos *et al.*, 2013) ce qui suggère l'existence de dialogues spécifiques. Un premier mécanisme a été décrypté par les équipes de Rotem Sorek et de Avigdor Eldar. Il implique la sécrétion par les lysogènes d'une petite molécule signal nommée arbitrium, AimP (Erez *et al.*, 2017; Aframian *et al.*, 2022) (Fig. 17).

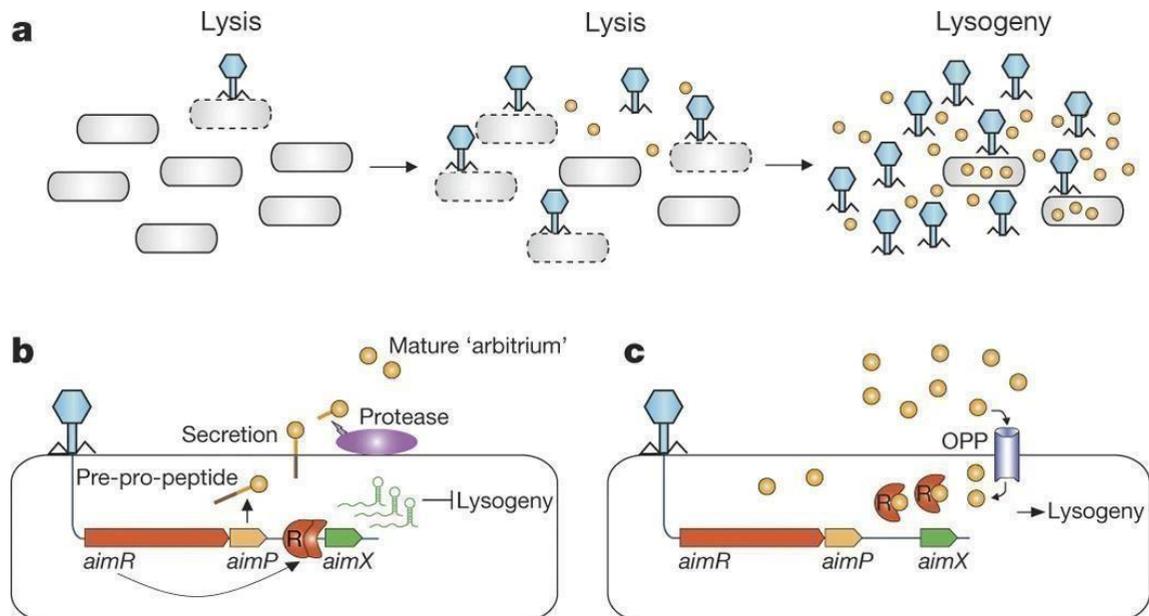


Figure 17 Décryptage du mécanisme arbitrium. **a**, Dynamique de l'accumulation du peptide arbitrium pendant l'infection d'une culture bactérienne par un phage porteur des gènes *aimR*, *aimP* et *aimX*. **b**, lors de la première rencontre, les gènes précoces *aimR* et *aimP* sont exprimés immédiatement post-infection. Le dimère AimR active l'expression de *aimX*. AimX est un inhibiteur de la lysogénie, et serait un petit ARN non codant dirigeant le phage vers un cycle lytique. Au même moment, AimP est exprimé sous forme d'un pré-pro-peptide. Il est sécrété et digéré par une protéase dans le compartiment extérieur pour produire le peptide mature. **c**, plus tard dans la dynamique de l'infection, le peptide mature arbitrium s'accumule dans le milieu et est internalisé dans le cytoplasme grâce au transporteur OPP. A partir de ce moment, lorsque le phage infectera la bactérie, AimR fixera l'arbitrium présent et ne pourra pas activer l'expression de *aimX*, ce qui introduit la préférence vers la lysogénie (Erez *et al.*, 2017).

Le mécanisme permet de contrôler le choix lyse-lysogénie lors de l'infection d'une cellule naïve par un phage tempéré. Lorsque des lysogènes sont entourées par d'autres cellules, le système leur sert également à mesurer la proportion de cellules lysogènes dans le voisinage. Si cette proportion est importante, il est inutile pour la cellule d'induire ses prophages dans le but d'infecter les cellules voisines. Le mécanisme Arbitrium va donc réprimer l'induction du prophage via le système SOS. Le mécanisme met en jeu une cascade d'étapes et implique les gènes *aimR*, *aimP* et *aimX* (Fig. 17). Le régulateur phagique AimR y joue un rôle-clé et fait partie de la famille des RRNPPA, nomenclature donnée selon les initiales des protéinesmembres : Rap (*Bacillus sp.*) ; Rgg, (*Streptococcus sp.*) ; NprRet Plcr (*B. cereus*) ; PrgX (*E. faecalis*) et AimR (phages infectant *Bacillus spp.*) (Felipe-Ruiz *et al.*, 2022).

La lysogénie et la poly-lysogénie sont coûteuses pour la cellule. Toutefois, elles confèrent également des avantages à la cellule hôte grâce à la présence de gènes d'origine bactérienne sur le prophage, qui sont nommés morons (pour « more genes on »). Leur présence augmente l'adaptation (fitness) de l'hôte *via* un large spectre de mécanismes et ils jouent un rôle important dans les maladies bactériennes (Burns *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2019) (Fig. 18). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les morons inhibent la motilité, l'adhésion, et la production de facteurs de virulence comme les rhamnolipides et l'élastase. Les morons portent également des gènes de protection de la cellule vis-à-vis de l'infection par d'autres phages.

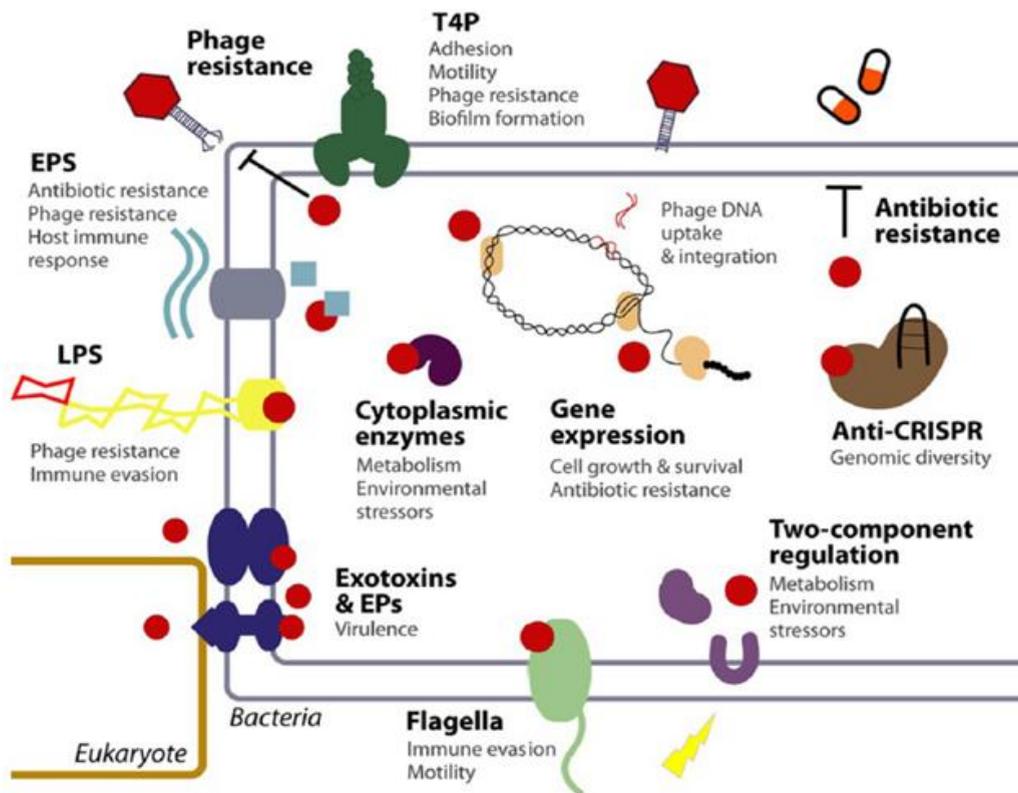


Figure 18 Modifications phénotypiques conférées par des morons (Taylor *et al.*, 2019). Des rôles dans la mobilité, le métabolisme et la virulence ont été mis en évidence. Les morons peuvent également conférer une résistance aux antibiotiques, à d'autres phages, ou à des stress environnementaux.

IV - 4 Autres cycles adoptés par les phages

Certains phages ont des cycles différents, comme les phages filamenteux (*Inoviridae*) qui mènent une infection chronique. Chez certains membres des *Caudovirales*, des cycles alternatifs à lalyse/lysogénie peuvent être également expérimentés dans l'hôte dans des conditions environnementales particulières (pseudo-lysogénie et carrier-state). Ces relations particulières entre le phage et la bactérie sont caractérisées par des différences en termes de trajectoire de la cellule infectée (lyse ou pas), et du virus (multiplication intracellulaire, libération des particules néosynthétisées dans le milieu extérieur ou pas).

IV - 4 - 1 L'infection chronique

Les phages dits filamenteux, comme M13 découverts en 1960, sont classés dans la famille des *Inoviridae*. Ils établissent une infection chronique qui ne tue pas l'hôte. Les phages produits sont secrétés hors des cellules et la concentration en particules peut atteindre 10^{13} virions/mL de culture.

Au niveau de leur morphologie, ces phages filamenteux forment des bâtonnets, dont la taille peut être supérieure à celle de la cellule infectée (**Fig. 12**). Le matériel nucléaire dans les capsides est constitué d'ADN sb, et peut exister à l'état libre et intégré dans le chromosome de l'hôte. Sa taille varie entre 5 et 20 kb ([Roux et al., 2019](#)). Chez *V. cholerae*, le phage Φ CTX porte la toxine impliquée dans la maladie ([Waldor et Mekalanos, 1996](#)).

L'exploration de 56 868 génomes microbiens et 6 412 métagénomés indique que 90% des espèces infectées par les phages filamenteux sont des bactéries à Gram négatives (Gammaprotéobactéries & Betaprotéobactéries) ([Roux et al., 2019](#)). Ces phages ciblent les pili, et entrent dans les cellules *via* la rétractation de la structure. Parmi les Inovirus caractérisés, les seuls capables d'infecter des hôtes à Gram positif sont B5 (*Propionibacterium freudenreichii*) et CAK1 (*Clostridium acetobutylicum*). Toutefois, selon [Roux et al.; \(2019\)](#), des espèces du genre *Arthrobacter* seraient également fréquemment infectées par des phages filamenteux, ainsi que des Archées.

La même étude rapporte l'association fréquente entre phages filamenteux et *Caudovirales*, qui pourraient agir soit en synergie, soit selon des interactions antagonistes dans la bactérie infectée.

IV - 4 - 2 Pseudo-lysogénie

Ce cycle peut être expérimenté par les phages caudés tempérés.

[Ripp et Miller \(1997\)](#) définissent la pseudo-lysogénie comme une interaction phage-hôte dans laquelle le matériel nucléaire viral n'établit pas de relation stable sur le long terme (lysogénie) et n'initie pas non plus de réponse lytique. La pseudo-lysogénie décrit donc un état transitionnel où le génome viral est porté comme un épisode instable dans l'hôte, distinct de la lysogénie. Le prophage peut être curé facilement par isolement ([Sakaguchi et al., 2005](#)).

L'état de pseudo-lysogénie est généralement associé à des situations de carences nutritives et correspond à une stratégie de survie des phages dans leur milieu naturel ([Hobbs et Abedon, 2016](#)). Lorsque l'apport en nutriments reprend, le génome peut alors établir une réelle lysogénie

ou s'activer pour produire et libérer des virions. La pseudo-lysogénie apporte des bénéfices aux deux partenaires (Mäntynen *et al.*, 2021).

IV - 4 - 3 Le carrier state

L'état de carrier-state (CS) a été décrit chez de nombreux phages lytiques appartenant à des groupes taxonomiques très différents comme PT14 (ADNdb) de *Campylobacter jejuni* (Hooton *et al.*, 2016), le Crassphage Φ crAss001 de *Bacteroides intestinalis* (Shkoporov *et al.*, 2021), le phage c2 chez *Lc. lactis* (Marcelli *et al.*, 2020) ou encore le phage ssARN LeviOr01 de *Pseudomonas aeruginosa* (Pourcel *et al.*, 2017).

Initialement observé par Lwoff (Lwoff, 1953), le phénomène traduit l'existence d'une hétérogénéité dans une population au regard de la présence de matériel nucléaire viral dans les cellules. Il est décrit comme un mélange de phages et de bactéries qui persistent dans un équilibre plus ou moins stable. Une sous-population résistante au phage contient le génome viral sous forme épisomique. L'existence du carrier state est liée à des modifications génétiques, la physiologie, une communication de type QS ou à une distribution spatiale particulière (biofilms). Dans la portion de cellules résistantes, certaines auront accumulé des mutations et ne produiront pas de phages (carrier cells). Les autres en seront capables. La sous-population sensible sera donc constamment infectée et ceci produira de nouveaux phages dans l'environnement. Dans la population résistante, la propagation continue du phage peut donc se faire à la fois par production de nouveaux virions et par transmission verticale de son génome (Cenens *et al.*, 2015; Sutton et Hill, 2019).

Contrairement à la pseudo-lysogénie, le CS a été décrit dans des conditions de croissance optimales pour l'hôte. Le CS confère des effets positifs pour la bactérie comme une meilleure adaptabilité aux conditions défavorables, et une immunité aux bactériophages.

Chez la bactérie lactique *L. lactis* MG1363, les auteurs ont découvert une situation chronique d'infection « bas grade » où une souche sur 270 est infectée par un phage de type c2 (Marcelli *et al.*, 2020). Lorsqu'un phage phylogénétiquement proche infecte la population, l'état latent du phage cesse et le phage en CS reprend son activité lytique, qui s'ajoute à celle du phage surinfectant. Ceci produit des échanges génétiques entre les phages et l'émergence de nouveaux variants.

IV - 5 Mécanismes bactériens de résistance aux phages

A chaque étape du cycle d'infection, les bactéries peuvent mettre en place des mécanismes de défense contre les bactériophages. Ils visent à limiter le phénomène d'adsorption des phages sur les récepteurs de l'enveloppe bactérienne, ce qui conditionne la suite de l'attaque virale. Il ne s'agit pas de la seule ligne de défense adoptée par les bactéries et d'autres mécanismes peuvent être dirigés contre le matériel nucléaire viral, lorsqu'il se retrouve dans le cytoplasme après injection. Comme indiqué précédemment, les prophages sont susceptibles de porter certains de ces mécanismes. Il est également fréquent d'observer la co-localisation de plusieurs types de mécanismes au sein d'îlots de défense dans les chromosomes bactériens (Bernheim et Sorek, 2020). Enfin, malgré la multiplication des systèmes, certains ne sont pas encore complètement élucidés, comme Zorya, Hachiman, Septu, Shedu, Lamassu, Gabija, ou encore Wadjet, qui ne seront donc pas abordés dans cette partie.

IV - 5 - 1 Le blocage d'adsorption des phages.

Les différents moyens de lutter contre l'adsorption des phages sont représentés Fig.19.

Le cas le plus fréquent face à une attaque de phages est **la perte du récepteur** (fonctionnalité/configuration spatiale) chez la bactérie. A l'origine du phénomène, on retrouve la présence de mutations ponctuelles dans le gène dédié (Fig. 19a). Les mutants sont qualifiés de BIM (Bacteriophage Insensitive Mutants). L'analyse de BIMs chez *Listeria monocytogenes* montre la présence de mutations provoquant la perte ou la déficience de la rhamnosylation des acides techoïques de paroi (Trudelle et al., 2019), et la diversification des serovars dans la population (Eugster et al., 2015).

La variation de phase peut avoir un effet similaire (Fig. 19e). Chez *Campylobacter jejuni*, de courtes régions zones polyG (7-11 pb) sont observées dans 20-30 gènes, codant essentiellement pour des composés qui modulent la surface de la bactérie (Sørensen et al., 2021). Pendant la réplication, des mésappariements induisent des indels dans les régions riches en G et conduisent à un changement de phase de lecture. A titre d'exemple, le phage F336 reconnaît la structure variable O-méthyl-phosphoramidate (MeOPN) qui est fixée au composé Gal β Nac du LPS (Sørensen et al., 2011). La variation de phase affecte l'expression de la O-méthyl phosphoramidate transférase, et est responsable de la résistance au phage. Chez d'autres modèles, la variation de phase se produit par recombinaison site-spécifique ou modifications épigénétiques (Fig. 19e).

La production accrue de matrice extracellulaire (EPS) peut permettre de masquer les récepteurs pariétaux des phages (**Fig. 19d**). Elle est fréquente chez les BL laitières.

Chez *E. coli*, **la synthèse d'inhibiteurs compétitifs** rend le récepteur indisponible. C'est le cas chez *E. coli*, qui produit une lipoprotéine Llp au début de l'infection, pour empêcher la fixation du phage T5 sur son récepteur FhuA (**Fig. 19b**).

Des vésicules membranaires portant des récepteurs de phage formées par la cellule mère puis détachées dans le milieu (OMV) pourraient agir comme des leurres, capables de piéger les phages et d'empêcher leur rencontre avec la bactérie. Le mécanisme est montré chez *E. coli* (**Manning et Kuehn, 2011**) et *Pseudomonas aeruginosa* (**Augustyniak et al., 2022**). Une autre hypothèse, en débat, propose que les OMV pourraient être responsables d'un effet contraire, à savoir le transfert de récepteurs à des cellules jusque-là résistantes (**Tzipilevich et al., 2017; Ofir et al., 2018; Ofir et Sorek, 2017**).

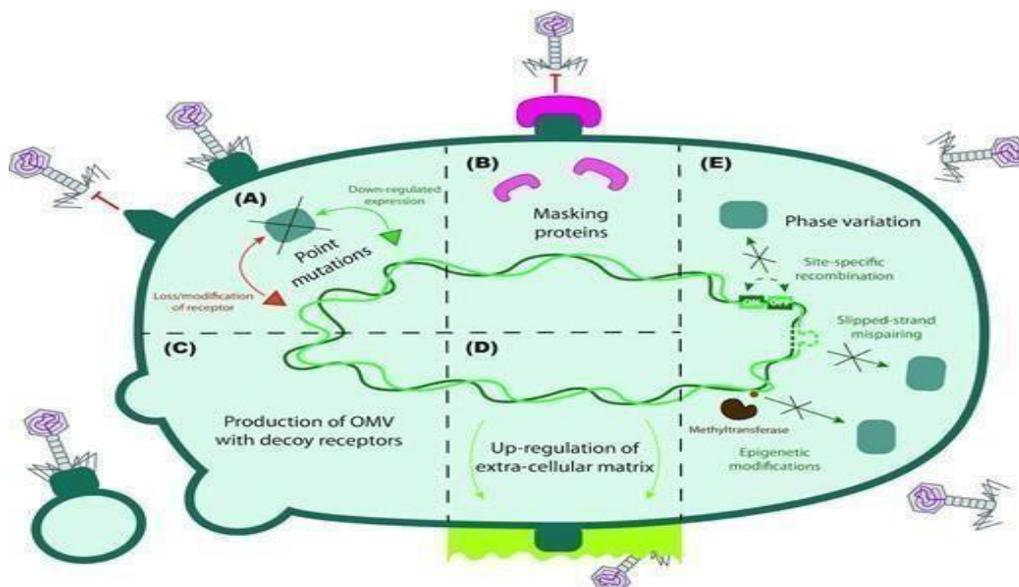


Figure 19 Moyens utilisés par la bactérie pour bloquer l'adsorption (**Egido et al., 2022**).

La perte de paroi est discutée par **Ongena et al. (2021)**. Elle est observée chez des souches de *E. coli* de patients atteints d'infections urinaires (**Mickiewicz et al., 2019**) et des bactéries à Gram positive traitées au lysozyme (**Kawai et al., 2018**). Cet état transitoire (dit forme L) serait adopté par une fraction de survivants pour résister à une contrainte et pouvoir régénérer la population.

IV - 5 - 2 Les systèmes d'exclusion de surinfection (Sie) par blocage de l'injection

Le système Sie a été découvert dans le prophage TP-J34 de *Streptococcus thermophilus*. Le

gène sie code pour une lipoprotéine de 142 acides aminés portant un peptide signal (LTP). Elle agit en bloquant l'injection d'ADN de certains phages dans la cellule déjà infectée (Labrie *et al.*, 2010) et exclue donc la surinfection de l'hôte par d'autres phages. Chez le phage T4, les protéines Imm et Sp bloquent la surinfection par les autres phages T-like. Elles inhibent la dégradation localisée du peptidoglycane, préalable nécessaire à l'injection de l'ADN à travers l'enveloppe (Lu et Henning, 1994).

IV - 5 - 3 Systèmes agissant par interférence avec les acides nucléiques

a. Les systèmes restriction modification (RM) & DISARM, et Pgl :

Les systèmes classiques, dits RM, sont composés d'une méthylase, qui méthyle l'ADN endogène pour le distinguer de l'ADN exogène, et d'une enzyme de restriction qui clive l'ADN exogène non méthylé. Il en existe quatre types. Lorsque l'ADN d'un phage pénètre pour la première fois dans une cellule hébergeant un système RM, il sera reconnu comme molécule étrangère par l'enzyme de restriction et sera rapidement dégradé, bien que l'ADN de l'hôte soit toujours protégé par l'activité de la méthylase. Lorsque le phage dont l'ADN est méthylé accidentellement, déclenchera un cycle lytique, les nouveaux virions seront insensibles à l'enzyme de restriction et infecteront facilement les cellules voisines contenant le même système RM.

DISARM (Defense Island System Associated with Restriction-Modification) représente également un mécanisme qui cible l'ADN viral. Il est constitué d'une méthyltransferase et de nucléases. Cependant, la reconnaissance du soi/non-soi et l'auto-immunité du système divergent par rapport à ce qui est connu chez les RM, et sont en cours d'étude.

Les systèmes BREX (BacteRiophage EXclusion) agissent également sur l'ADN viral et en bloquent la réplication. Le système Pgl (BREX type II) fonctionne de façon opposée aux RM, dans le sens où c'est l'ADN modifié qui est ici dégradé. La modification du génome viral est assurée par le système de défense de l'hôte. Il a été décrit pour la première fois chez le phage ϕ C31 qui infecte *Streptomyces coelicolor* A(3)2. Les études ont montré que les particules libérées après une première infection d'un hôte Pgl⁺ n'étaient pas éliminées. Ceci intervenait uniquement lors des cycles d'infection ultérieurs.

b. Clivage d'acide nucléique phagique, le mécanisme **CRISPR-Cas** :

Le système CRISPR-Cas est le système immunitaire adaptatif des bactéries qui lutte contre les éléments génétiques envahissants comme les phages et les plasmides (Jinek *et al.*, 2012). Il est

constitué de **séquences répétées nommées DR** (clustered regularly interspaced short repetitive elements), séparées par de courtes **séquences ou spacers**, chacune correspond à de l'ADN étranger cible et enfin **un opéron de gènes *cas*** (Cluster Associated) (**Fig. 20**).

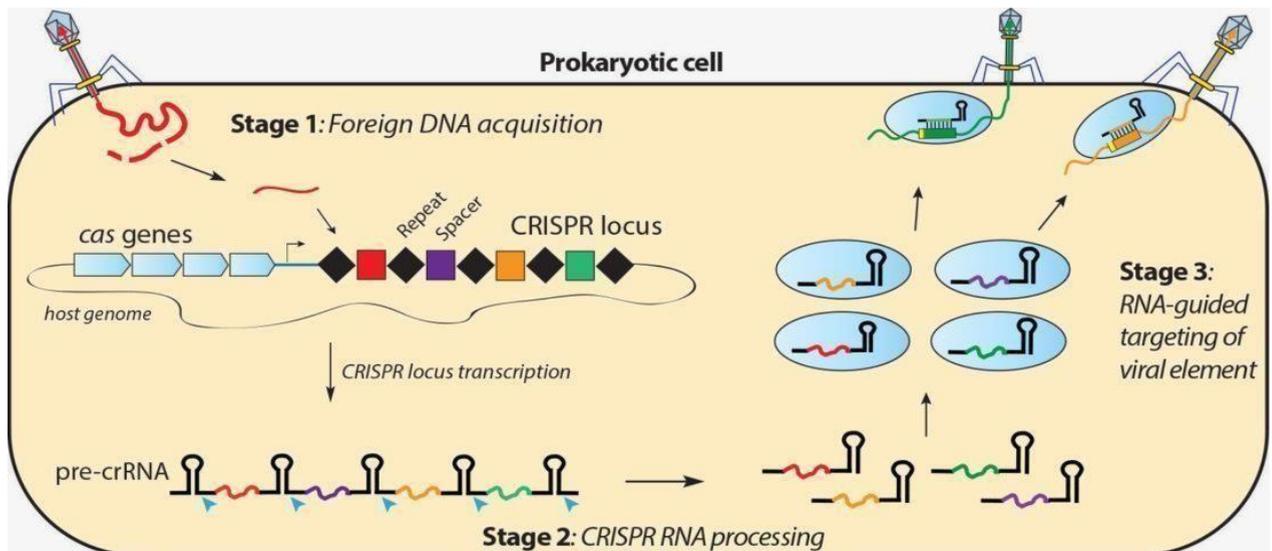


Figure 20 Mécanisme CRISPR/Cas (type II) (Doudna Lab©, 2022).

Les systèmes CRISPR sont largement présents chez les bactéries et Archées, et ils se divisent en deux classes, six types et plusieurs sous-types. Les différences reposent sur (i) la composition des gènes *cas*, et chaque type possède un gène *cas* spécifique associé (type I, *cas3* ; type II, *cas9*, type III, *cas10* ...) ; (ii) les séquences répétées DR ; et enfin (iii) le mécanisme réactionnel à l'intérieur de la cellule (Makarova *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2016; Yang et Patel, 2017).

L'acquisition est la première étape du processus. En réponse à la présence de phages ou de plasmides, des fragments nommés protospacers sont incorporés dans le locus CRISPR du génome bactérien en tant que nouveaux spacers. Chaque unité nouvellement acquise sera responsable de la résistance de l'hôte bactérien à des phages de la même espèce, représentant une mémoire de l'infection antérieure. Tout génome de phage entrant portant un protospacer présentant 100 % d'identité nucléotidique avec le spacer sera inactivé et son cycle lytique bloqué (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

Pendant **les phases d'expression et d'interférence**, l'élément spacer est transcrit en molécule ARN précurseur CRISPR (pre-crRNA). Sa digestion enzymatique génère de courts crRNAs, qui peuvent établir un duplex avec la séquence du phage ou du plasmide. La structure dirige l'endonucléase à introduire une cassure sur le duplex formé. L'analyse des spacers peut contribuer également à la prédiction des hôtes bactériens. En 2021, une base de données

(“CRISPR Spacer Database and Exploration Tool,” n.d.) rassemblant plus de 11 millions de spacers a été créée pour améliorer les prédictions d'hôtes sur de grands ensembles de données virales et donc mieux comprendre leur rôle écologique (Dion *et al.*, 2021).

c. Les Vipérines :

Des analogues de Vipérines eucaryotes ont été récemment identifiés chez les procaryotes. Ils font partie de la superfamille des enzymes à « radical SAM » et sont impliqués dans l'inhibition de la transcription de l'ARN polymérase du phage T7 et de multiples virus en produisant des bases modifiées (ribonucléotide 3'-deoxy-3',4'-didehydro (ddh)-cytidine triphosphate ou ddhCTP), qui agissent comme des terminateurs de chaîne sur l'ARN polymérase virale (Bernheim *et al.*, 2021).

IV - 5 - 4 Systèmes d'infection abortive ou suicides

Les bactéries portent une large gamme de protéines hétérologues qui offrent une résistance en provoquant l'avortement de l'infection par les phages (Fig. 21). Les mécanismes conduisent au suicide de la cellule infectée afin de limiter la libération de néovirions. Initialement décrits chez *E. coli* et *Lc. lactis*, ils sont aujourd'hui présents et étudiés chez de nombreux modèles, ce qui révèle des mécanismes très variés. Quatre d'entre eux sont présentés Fig. 21.

Les systèmes de défense CRISPR-type III, CBASS (cyclic nucleotide-based antiphage signaling system), PYCSAR (pyrimidine cyclase system for antiphage resistance), et Thoeris ont la particularité d'utiliser les nucléotides cycliques comme messagers afin d'activer une variété de protéines effectrices. Elles dégradent des éléments-clés comme les acides nucléiques, les membranes, ou encore des métabolites, afin de limiter la réplication du virus (Bernheim *et al* Sorek, 2020; Athukoralage et White, 2021).

IV - 6 Contre-mesures développées par les phages

Parallèlement à la découverte de la complexité des mécanismes bactériens de résistance aux phages, des preuves d'existence de contre-mesures par les phages ont également été obtenues (Samson *et al.*, 2013). Ainsi, les phages de *C. jejuni* miment leur hôte en utilisant également le phénomène de variation de phase pour modifier leur anti-récepteur, et ainsi pouvoir s'adapter aux changements de la paroi de l'hôte bactérie (Sørensen *et al.*, 2021).

D'autres phages sont capables de capturer de nouvelles gènes et fonctions associées, afin de

contourner le mécanisme de résistance bactérien. C'est le cas de méthylases qui protègent le phage de l'action des RM, et de dépolymérasés, capables de dégrader les EPS. D'autres systèmes comme Ocr (Isaev *et al.*, 2021), Paris (Rousset *et al.*, 2022), ou encore les protéines Acr (Hynes *et al.*, 2017; Stanley *et al.*, 2019) sont des antagonistes de BREX, des enzymes de restriction et de CRISPR, respectivement. Ils sont fréquemment associés à des prophages complets ou vestigiaux.

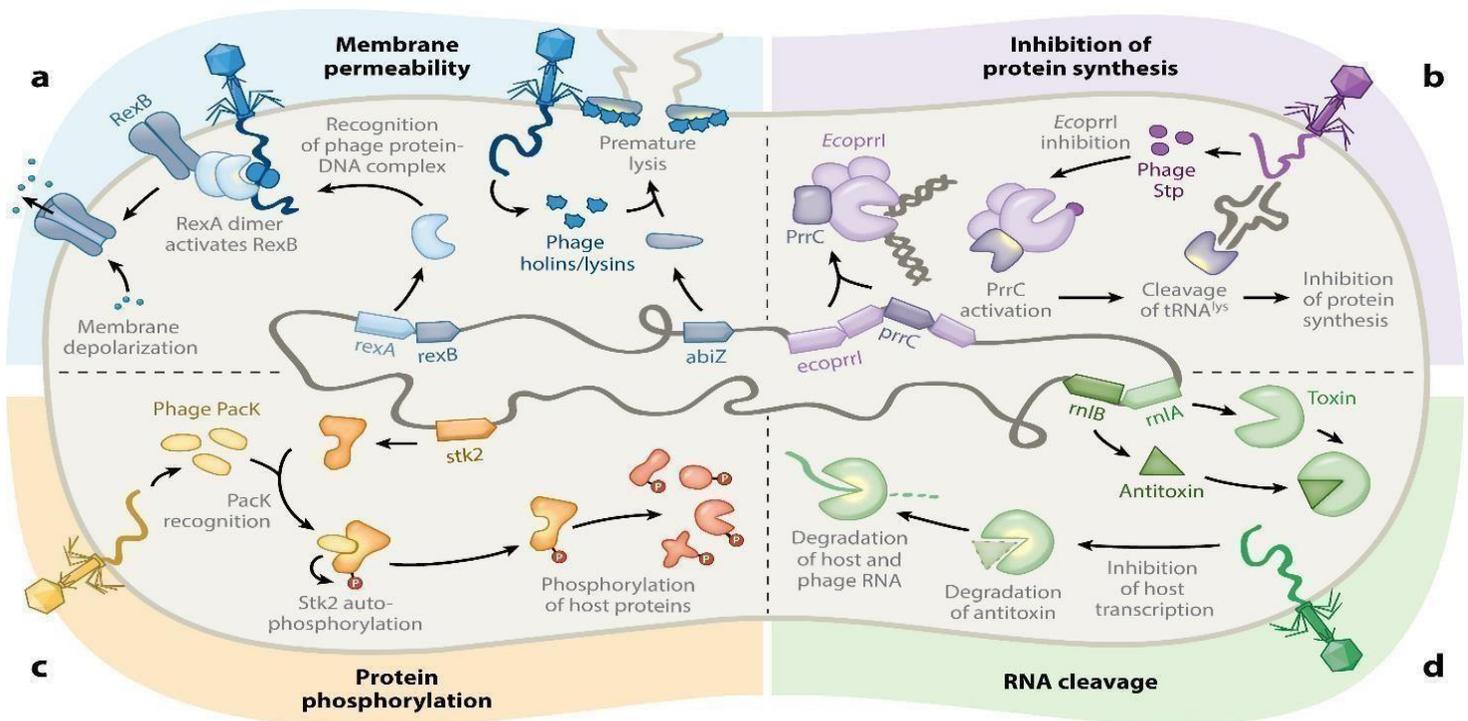


Figure 21 Mécanismes d'action de quelques système abortifs (Lopatina *et al.*, 2020). **a**, RexAB et AbiZ ciblent les membranes. RexA détecte un complexe intermédiaire protéine-ADN, formé pendant la réplication. Il active RexB, qui forme un canal dans la membrane. AbiZ reconnaît les holines et les lysines virales et agit de manière coopérative avec eux pour induire une lyse précoce des cellules ; **b**, les protéines PrrC et EcoprrI sont associées. La protéine Stp du phage T4 se fixe sur EcoprrI et l'inhibe, ce qui active PrrC. Sous cette forme activée, la protéine clive le tRNA^{lys}. La traduction est bloquée et l'infection virale s'arrête ; **c**, la kinase Stk2 est activée par la protéine virale Pack. Elle peut alors phosphoryler plusieurs protéines ce qui mène à la mort cellulaire ; **d**, RnlAB est un système Tox-Antitox, constitué de la toxine RnIA qui est une endoribonucléase, et l'antitoxine RnlB. Lors de l'infection par T4, la synthèse protéique est arrêtée. Parce que l'antitoxine est instable, elle est rapidement dégradée. Ceci libère la toxine, qui clive de manière indifférenciée l'ARN viral et bactérien.

IV - 7 Co-évolution et scénarii d'interactions dans les écosystèmes

La présence de bactéries et de phages dans les écosystèmes naturels mène donc à des évolutions de la résistance de chaque entité, selon un processus de co-évolution ressemblant à une course à l'armement. Des modèles décrivant la dynamique des populations phages-bactéries ont été décrits et peuvent être séparés en deux groupes.

IV - 7 - 1 Faibles variabilité et diversité des populations

La dynamique Arm-Race (ARD) est caractérisée par une compétition au niveau de la survie qui est alimentée par les interactions entre prédateur et proie. La population bactérienne développe des contre-mesures tandis que le phage essaie de les contourner ([Hampton et al., 2020](#)). Cela produit l'extinction des phages et des bactéries qui ne sont pas "up to date" et seules les populations résistantes se développent.

La dynamique dite de Piggyback-the-Winner (PtW) est alimentée par des interactions de type mutualiste qui se produisent lors du cycle lysogénique ([Knowles et al., 2016](#)). Cette dynamique est caractérisée par de faibles variabilités et diversité des populations en phage et en bactérie. Ceci mène à peu de compétition grâce aux avantages retirés par les différents acteurs. PtW est le seul modèle dans lequel la dynamique des populations est connectée au cycle lysogénique.

IV - 7 - 2 Fortes variabilité et diversité des populations

Deux modèles de dynamique sont proposés: la sélection fluctuante ou FSD ([Hall et al., 2011](#)) et la dynamique "Kill-the-winner" ([Thingstad, 2000](#)). Ils sont tous les deux alimentés par une forme de sélection naturelle dans laquelle le fitness d'un génotype est inversement proportionnel à sa fréquence ([Clarke, 1972](#)).

La dynamique FSD s'explique de par l'existence de coûts pour la bactérie lorsqu'elle met en oeuvre des mécanismes de résistance aux phages, qui ne sont pas avantageux dans un environnement dans lequel plusieurs espèces bactériennes cohabitent. Le fonctionnement des mécanismes de résistance entrainera une chute du nombre de virions. Alors que la prédation décroît, les populations résistantes aux phages seront dépassées par les populations qui n'ont pas investi dans les mécanismes de défense. La conséquence est une bascule dans la communauté où les bactéries résistantes aux phages sont remplacées par des bactéries sensibles. Dans ce nouvel environnement favorable, la prédation peut alors reprendre, ce qui rend de nouveau la niche favorable à la croissance des bactéries résistantes ([Avrani et al., 2012](#)). La dynamique "Kill-the-winner" se déroule lorsque l'abondance de l'espèce la plus adaptée ou "winning" se retrouve sous le contrôle de la prédation par les phages, qui l'élimine. Le modèle prédit la coexistence de différentes populations en bactéries et en phages par élimination de l'expansion des populations les plus compétitives ([Thingstad, 2000](#)).

Tous ces modèles peuvent être classés différemment selon la nature des phages et leurs modalités d'interaction avec les bactéries: phages lytiques (ARD, KtW, and FSD) et tempérés

(PtW). Le cycle suivi par les phages dans l'environnement peut être suivi par mesure du ratio Virus-Bactéries(VBR), et un taux inférieur à 1 suggère la prévalence du cycle lysogénique alors que des taux supérieurs suggèrent la prévalence du cycle lytique.

V Les interactions BL-phages dans les aliments fermentés

Ce chapitre présente les **évolutions récentes au niveau des outils** d'étude des phages qui ont fait progresser les connaissances sur leur **prévalence et leur impact** que ce soit au cours des fermentations, dans le produit fini et enfin dans le TGI après leur consommation (Leech *et al.*, 2020). Une synthèse des connaissances acquises dans les domaines laitier et oenologique est présentée. Enfin, les phages peuvent être à la base de **nouvelles stratégies de biocontrôle**, et offrir des alternatives à l'usage de conservateurs pour lutter contre les flores indésirables.

V - 1 Nouvelles approches au service de l'exploration des interactions hôtes-phages dans les aliments fermentés

V - 1 - 1 La détection et la quantification sans à priori.

La technique de double-couche a longtemps été la seule approche de détection et de visualisation des phages. Elle requiert de disposer de souches sensibles. Son utilisation est également limitée par la réduction possible de l'activité des particules par des composés présents dans certains aliments, comme l'acidité et la présence de composés polyphénoliques, toutes deux évoquées dans les vins (Jaomanjaka *et al.*, 2016; Philippe *et al.*, 2020).

D'autres approches d'étude sont disponibles comme l'épifluorescence en présence de SYBR green qui permet l'observation et la quantification des particules (Zago *et al.*, 2012). D'autres approches (interferometric light microscopy, unalbe resistive pulse sensing, nanoparticle flow cytometry, dynamic light scattering, et nanoparticle-tracking analysis) sont en cours d'évaluation (Sausset *et al.*, 2022). Le Videodrop (Société Myriade, France) basé sur l'interférométrie permet de dénombrer les particules dans le fromage (Dugat-Bony *et al.*, 2020). Selon le milieu analysé, il est parfois difficile de distinguer les phages des vésicules membranaires.

La quantification des phages dans les aliments bénéficie également des nouvelles approches de PCR quantitative & digitale (ddPCR). Elles sont essentielles pour la détection et le dénombrement de pathogènes comme les souches *E. coli* productrices de Shiga toxine (STEC)

(Spilsberg *et al.*, 2021), ou encore la détection précoce de phages en milieu laitier (le « Delvo® Phage test kit », de la société DSM, détecte les phages en moins d'une heure).

V - 1 - 2 L'accès aux viromes

L'analyse des métagénomiques d'aliments permet un premier accès aux prophages présents dans le génome des bactéries et apporte une première réponse quant à l'implication des phages dans la régulation des populations bactériennes. C'est le cas dans les produits laitiers (Romero *et al.*, 2020), les vins (Chaïb *et al.*, 2022a), le cidre (Ledormand *et al.*, 2021), le Kimchi (Park *et al.*, 2022), les fermentations de soja (Chukeatirote *et al.*, 2018). ou encore le kéfir (Tenorio-Salgado *et al.*, 2021).

Pour mieux comprendre les dynamiques, la métagénomique doit être parallèlement appliquée aux microorganismes et à la population virale. Cette dernière doit être purifiée au préalable à partir des matrices alimentaires (Mahony et van Sinderen, 2022). Les études sont encore peu nombreuses, et portent sur le Kimchi (Park *et al.*, 2011), le cidre (Ledormand *et al.*, 2022a), les fromages comme l'Époisse, l'ambiance des usines de production laitière (Colombo *et al.*, 2018), et plus récemment sur des matières premières non transformées (coquillages, chair de poisson et de poulet collectés (Blanco-Picazo *et al.*, 2022). L'accès au virome nécessite la mise au point d'un protocole exigeant. Les aliments liquides sont tout d'abord centrifugés. Les aliments solides sont au préalable homogénéisés dans un tampon de désorption. Le surnageant obtenu est filtré. La poration de 0,22 µm semble limitante et des filtres de 0,45 µm sont préférés. Le PES est également préféré à l'acétate de cellulose pour son adsorption moindre des particules. La concentration des particules est l'étape-clé et peut s'effectuer par précipitation au PEG, floculation en présence de chlorure de fer (couplé à l'usage de filtres 0,8 µm), filtration tangentielle (cut-off de 100 kDa) ou centrifugation longue à vitesse élevée (Langenfeld *et al.*, 2021). L'efficacité des méthodes peut être appréciée par une approche dite de spiking, qui consiste à ajouter une quantité connue de particules en début de protocole. La filtration tangentielle semble très efficace dans les essais menés dans le cidre. Toutefois la filtration ultérieure du retentât recouvre seulement 1 phage sur 1000. De plus, aucune trace d'ADN n'est détectée pour des concentrations initiales de spiking inférieures à 10⁷ UFP/mL tandis que l'ajustement du cidre à pH à 5,5 avant extraction de l'ADN semble également essentiel (Ledormand *et al.*, 2022b). De façon générale, l'impact de la pression osmotique sur l'intégrité des particules au cours du protocole est certainement un facteur important, et reste

peu étudié. Après précipitation des particules, l'ADN est extrait et ensuite séquencé par approches HiSeq/MiSeq. Une étape de reverse-transcription est recommandée afin de détecter les phages à ADNsb, comme les phages filamenteux ([Gendre et al., 2022](#)).

Les outils et serveurs bio-informatiques dédiés à l'analyse de phageomes comme Vibrant ([Kieft et al., 2020](#)) ou de détection d'homologies réduites comme PHROG ([Terzian et al., 2021](#)) se sont considérablement développés. Toutefois, le nombre de séquences dans les banques de données reste à compléter. Ainsi, les viromes récemment issus de crevettes, kimchi, choucroute, ou de cidre montrent une partie non caractérisable (dark matter) qui avoisine 50% des séquences virales, qui restent sans homologues après interrogation des banques.

L'étude des viromes révèle parfois une plus grande diversité taxonomique dans le domaine agronomique et reflète peut-être un certain nombre de facteurs spécifiques alors que les métagénomés présentent moins de richesse et de diversité dans les reads d'origine virale ([Mahony et van Sinderen, 2022](#)). L'analyse des viromes d'aliments végétaux fermentés semble être un biomarqueur plus précis de la zone géographique de l'aliment que l'analyse des populations microbiennes et pourrait représenter une nouvelle manière d'assurer la traçabilité des aliments. L'approche pourrait aussi renforcer la sécurité des aliments. Par exemple, la présence de nombreuses particules phagiques aptes à transduire des gènes de résistance aux antibiotiques (ARG) est récemment questionnée dans les matières premières animales entrant dans la chaîne alimentaire ([Blanco-Picazo et al., 2022](#)). Des résultats contradictoires ont été obtenus à l'INRAE de Jouy en Josas, sur des échantillons fécaux de porcs ([Billaud, 2021](#)).

V - 2 Les attaques virales en cours de fermentations et leur impact

V - 2 - 1 Milieu laitier

L'importance des interactions entre les phages et les BL dans les aliments fermentés a été illustrée en premier lieu dans les matrices laitières où le premier phage a été isolé dès 1935 ([Whitehead et Cox, 1936](#)). Le système de production laitière s'est progressivement appuyé sur l'inoculation de quelques souches commerciales dans un lait thermisé, débarrassé de sa flore indigène. Ceci a rapidement mené à des épisodes d'attaques virales, capables de stopper ou de ralentir la fermentation, générant dans ce cas une altération des qualités organoleptiques

du produit (Romero *et al.*, 2020). Le volume de production soumise à une infection virale est estimé à 10% à l'échelle mondiale.

La fréquence des attaques et l'importance du marché des produits laitiers ont alimenté de nombreuses recherches sur les phages des BL, dans le double objectif de sélectionner des cultures résistantes, et de modifier les pratiques afin de limiter la présence de phages dans les enceintes de production. Les couples BL laitières-phages représentent les modèles les mieux caractérisés du point de vue des interactions hôte-phage. Les espèces d'intérêt sont les flores acidifiantes et les flores d'aromatisation associées aux yaourts, laits fermentés et fromages. Elles correspondent aux espèces *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* et *Lactobacillus* spp. (Romero *et al.*, 2020; Paillet et Dugat-Bony, 2021).

Les risques associés aux matières premières (lait, poudre de lait, lactosérum concentré) et aux cultures (lysogénie) sont mieux cernés et l'importance des approches de nettoyage, et la nécessité de mettre en place de cultures de rotation sont renforcées. Les groupes de phages les plus problématiques ont été identifiés (groupes 335 et 936 chez *Lc. lactis* par exemple) et l'émergence de nouveaux génotypes nécessite une surveillance constante. Ainsi trois nouveaux groupes de phages virulents infectant *S. thermophilus* ont été récemment identifiés (5093, 987 et P438). Ils sont le résultat d'échanges entre phages de *S. thermophilus* et de *L. lactis* ou entre phages laitiers et phages d'autres réservoirs non laitiers. Les échanges peuvent concerner des modules, ou uniquement les gènes de BPP (protéines de baseplate) à l'intérieur du module dédié (Hanemaaijer *et al.*, 2021). Durant les dernières décennies, les producteurs de levains laitiers ont isolé, analysé et conservé des milliers de phages. Malgré l'apport de CRISPR dans l'amélioration des souches de *S. thermophilus*, la vision industrielle est que l'éradication des phages en milieu laitier reste une utopie (Romero *et al.*, 2020).

V - 2 - 2 Fermentation du cidre

Des suivis de fermentations artisanales et industrielles montrent la présence d'un virome complexe et peu abondant, mais toutefois corrélé aux bactéries présentes dans la boisson. On note l'absence d'oénophages et de phages de BL, bien que *O. oeni*, *O. sicerae*, et d'autres BL (pédiocoques, leuconostoques et lactobacilles) soient responsables de la FML. Ceci suggère que les cidres testés n'avaient pas (encore) réalisé la FML. Un seul phage actif a été isolé en testant les échantillons par la méthode de double-couche, et ceci malgré l'usage de 160 hôtes

possibles. Des essais de perturbations de communautés (BL et levures) ont été réalisés en milieu modèle (bouillon MRS pH 5,5) en chauffant une culture de quatre souches de BL à 50°C pendant 10'. Deux phages ont été introduits 24-48 h après le choc thermique. Leur addition a permis une restauration plus importante de la communauté de bactéries ([Ledormand et al., 2022b](#)).

V - 2 - 3 Les vins et la FML

La présence d'oenophages (phages infectant *O. oeni*) dans les vins a été rapportée dès le début des années 1980. L'objectif des études était alors de définir si les phages pouvaient détruire la population bactérienne et affecter de manière significative le déroulement de la FML. Le potentiel prédateur de phages isolés a donc été testé *in vino*. Des vins de Shiraz (pH 3,5; sans SO₂) ont été débarrassés de leur flore indigène par filtration, puis inoculés avec deux souches sensibles, et enfin infectés par des phages (10³ UFP). Aucune modification de la trajectoire de la culture n'a été observée et la FML s'est déroulée sans problème ([Davis et al., 1985](#)). Dans l'étude suivante, des vins blancs et rouges ont été filtrés, et inoculés par un phage (Lco23, isolé de Chasselas blanc de Suisse, ou S1.1s, collecté à partir d'un vin rouge australien) ainsi que sa souche de propagation. Les essais ont été comparés à une culture non infectée ([Henick-Kling et al., 1986](#)). S1.1s a inhibé le déroulement de la FML dans le vin rouge et ceci à trois pH différents: 3,25; 3,5 et 4. Le pic et la fin de FML ont été décalés de 8 et 2 jours, respectivement, à pH 3,25. Cependant, le phage Lco23 n'a pas modifié la trajectoire de la culture dans le vin blanc. Il a été ensuite montré que l'activité des phages S1.1s et Lco23 était optimale à pH 3,5 et pH 5,5, respectivement.

Ces expériences menées en mono-culture ont démontré que la prédation peut se dérouler malgré les conditions difficiles rencontrées dans les vins. L'acidité et probablement des contenus différents en composés polyphénoliques entre vins rouges et blancs modulent l'infection et expliquent peut être le caractère sporadique des infections et la difficulté à les mettre en évidence. Des essais ultérieurs menés en milieu MRS avec ou sans polyphénols ont suggéré des effets protecteurs de plusieurs flavonoïdes (quercétine, myricétine et acide *p*-coumarique) sur la population bactérienne ([Chaïb et al., 2022b](#)). Les vins seraient donc plus ou moins permissifs vis-à-vis de la propagation lytique des phages sur *O. oeni*.

Les essais précédemment évoqués ont été réalisés en mono-culture, et les cellules ont été placées en présence de concentrations élevées en phages. Ces conditions sont très éloignées de

celles qui prévalent dans les fermentations spontanées. Trois éléments essentiels sont à considérer pour appréhender la complexité des interactions hôte-phages dans l'environnement oenologique:

- l'interaction se déroule dans des conditions dynamiques, en ce qui concerne la composition physico-chimique (moût; FA; FML) et l'état de la bactérie (adhéré à un support et/ou planctonique dans le liquide);
- la population qui réalise la FML comporte plusieurs souches de *O. oeni*; leur présence est le résultat d'une sélection naturelle depuis la surface des baies et/ou des matériaux, jusqu'à la fin de l'étape de FA;
- les souches cohabitent avec des oenophages variés, dont il a été montré qu'ils sont majoritairement tempérés. Toutefois, la preuve de l'existence de phages strictement lytiques, nommés Vinitor et Krappator, a été apportée ultérieurement en étendant leur recherche aux premières étapes de la vinification (baies écrasées ; moûts) (Philippe *et al.*, 2017, 2021); enfin, les phages tempérés sont susceptibles de muter favorisant l'émergence de dérivés dont la réplication est limitée au seul cycle lytique. Ils sont qualifiés d'ex-tempérés, comme OE33PA (Jaomanjaka *et al.*, 2016).

La population de *O. oeni* pourrait subir des attaques lytiques par des phages virulents ou tempérés (par exemple au stade baies/moûts), et/ou lyser après induction massive de la population lysogène en présence de signaux spécifiques qui restent à déterminer.

L'état lysogène chez *O. oeni* a été étudié au laboratoire. Le taux de lysogénie a été mesuré dans la population de souches collectées en fin de FML (94 souches issues de 11 vins collectés en fin de FML spontanées dans trois domaines). Des pourcentages homogènes ont été obtenus dans chaque château (24%, 65% et 86%). L'étude devra être élargie aux étapes précédentes (moûts, FA). Les résultats sont compatibles avec la conclusion d'une étude *in-silico*, dans laquelle 58% des 231 souches séquencées contiennent un, deux, ou trois prophages (Claisse *et al.*, 2021). D'autre part, il a été montré que le spectre d'hôte d'une souche sensible est réduit lorsqu'elle est lysogénisée de façon contrôlée par un phage donné (Chaïb *et al.*, 2022a). Ceci suggère que la lysogénisation pourrait être un avantage pour l'hôte bactérien, en le protégeant d'attaques virales ultérieures, et pour le phage en le protégeant de l'extérieur. Ceci pourrait expliquer pourquoi de nombreux levains FML sont lysogènes ou poly-lysogènes (Chaïb, 2021; Chaïb *et al.*, 2022b), contrairement à ce qui se pratique dans le domaine laitier.

Le mécanisme de la recombinaison site-spécifique des oenophages tempérés implique six sites identifiés dans le chromosome bactérien (nommés *attB_A* à *attB_F*) (Fig. 22a). Ils correspondent tous à des gènes codant des tRNA. La RSS est assurée à chaque site par une intégrase spécifique et les phages sont nommés *int_A* à *int_F* en référence aux sites ciblés. Les génomes des phages des groupes *int_A*, *int_B* et *int_C* partagent de fortes homologies ainsi que certains gènes/modules. Les phages du groupe *int_D* sont plus distants. Ils ont également la particularité d'être intégrés sur le réplicore gauche, alors que tous les autres prophages sont sur le réplicore droit (Claisse *et al.*, 2021). Toutefois, cette observation n'est peut-être qu'un biais, lié aux difficultés d'assemblages des génomes issus du séquençage en approche Illumina. En effet, de nouvelles analyses par séquençage "long read" de la souche VP41, qui contient deux prophages *int_A* et *int_D*, montrent l'inversion de la région de 680 kb située entre les deux opérons ribosomiques. Ceci positionnerait les prophages *int_A* et *int_D* sur le réplicore droit, et tous les autres sur le réplicore gauche (Fig. 22b).

Il est intéressant de noter que les prophages infectant *O. oeni* semblent spécifiques vis-à-vis des types de boissons. Les vins blancs portent uniquement un sous-type de type *Int_A*, contrairement à ce qui est observé dans les vins rouges où ils sont plus variés, et co-existent avec d'autres types. Les prophages de kombucha sont de type *Int_F* et ne sont trouvés dans aucune autre boisson.

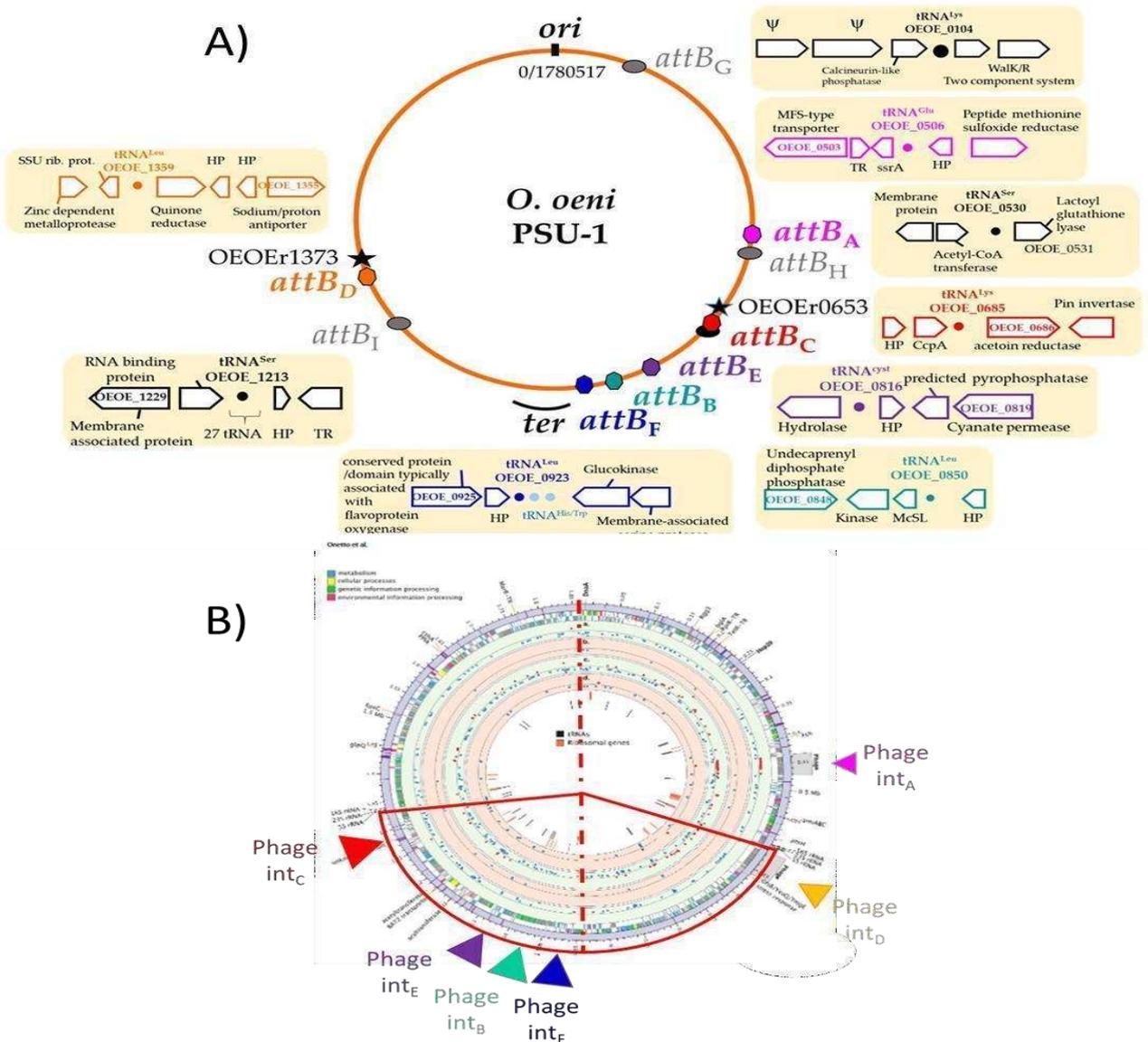


Figure 22 Représentation des sites d'intégration des prophages complets (en couleur) et vestigiaux (en gris) (A) et changements induits en situation d'inversion de la région située entre les opérons ribosomiques (portion en rouge) chez la souche VP41 (B) (adapté de [Claisse et al., 2021](#) et [Onetto et al., 2021](#)).

Enfin, la famille des MGE chez *O. oeni* comprend également des **prophages vestigiaux** aussi nommés PR (phage remnants). Comme les prophages actifs, ils sont intégrés dans des tRNA. Ils représentent des formes délétées de prophages (12-15 kb), ayant conservé le gène de l'intégrase et quelques gènes de structure. Ils peuvent co-exister en tandem avec des prophages aux sites C, D et F, notamment. D'autres îlots sont présents à des sites originaux, non ciblés par des prophages actifs (sites G, H et I) ([Fig. 22a](#)).

La compréhension de l'impact des phages sur le déroulé des fermentations passe par une meilleure compréhension des modalités de reconnaissance entre la particule et l'hôte. L'infection de la souche IOEB277 par les phages OE33PA ou Vinitor 162 a permis d'isoler des BIMs. Aucune résistance croisée n'a été observée chez ces premiers mutants, ce qui suggère

que les récepteurs utilisés par les deux phages sont différents. Ceci est confirmé par l'analyse des génomes, où les modules de structure contiennent des gènes distincts (Fig. 23a).

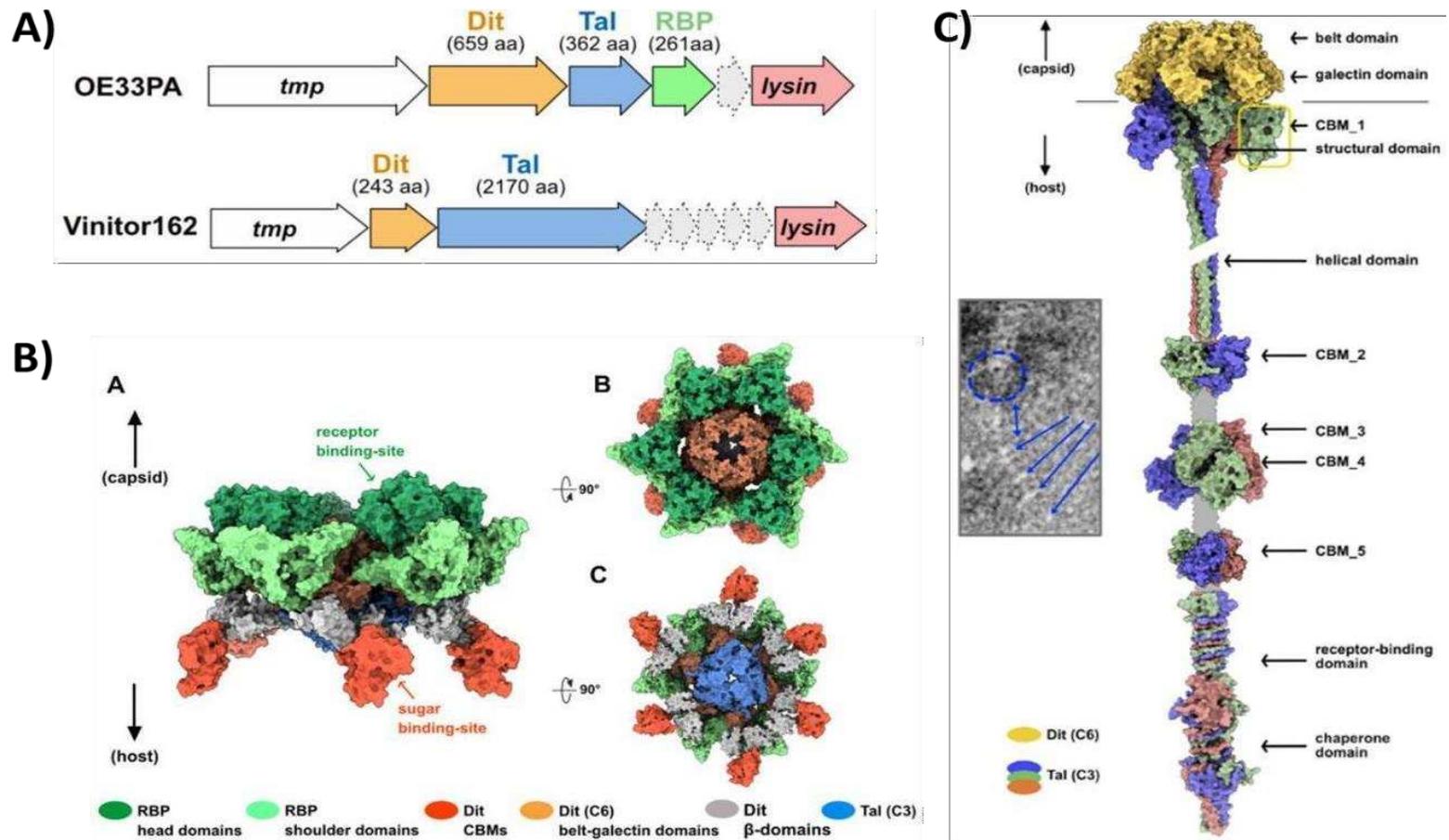


Figure 23 Organisations des gènes impliqués dans la reconnaissance de la paroi de *O. oeni* par les phages OE33PA et Vinitor 162 (A) et modèles topologiques de la queue de OE33PA (B) et de Vinitor 162 (C) (Goulet et Cambillau, 2021).

L'analyse de leurs séquences par le logiciel Alfold2 donne une prédiction précise de la topologie des structures engagées dans la reconnaissance de l'hôte (Goulet et Cambillau, 2021) (Fig.23). La structure de OE33PA nécessite trois composants, Dit, Tal et la RBP (Fig. 23b). Cet équipement est proche de celui des phages 1358 et p2 de *L. lactis*. Par analogie avec la situation rencontrée chez p2, des interactions entre des motifs de fixation de carbohydrates (CBMs) et leurs récepteurs pourraient entraîner des changements de conformation de la protéine Dit, et la réorientation de la RBP face à la paroi permettrait la transition vers un état irréversible de la fixation. Chez Vinitor 162, la structure implique deux protéines différentes seulement (Dit, Tal) et le complexe comporte un hexamère de Dit et trois protéines Tal (Fig. 23c). La protéine Tal est très longue (2170 acides aminés) comme également observé chez les membres du groupe P335 infectant les lactocoques, et les groupes *cos* et *pac* infectant *S. thermophilus*. Le domaine faisant office de récepteur (receptor-binding domain, ou RBD) est situé à l'extrémité et est suivi d'une chaperonne, qui assure le repliement correct. Comme

chez OE33PA, on retrouve un nombre élevé de motifs de fixation aux carbohydrates 15 CBMs (5 par monomère de Tal) et trois sur la RBDs.

La structure de la queue du phage virulent X27 n'est pas élucidée.

La souche IOEB277 synthétise des EPS solubles et capsulaires ([Dimopoulou et al., 2016](#)). Il s'agit (i) d'hétéropolysaccharides (HePS) constitués de glucose, galactose et rhamnose, essentiellement sous forme capsulaire (ii) d'un premier homopolysaccharide de type β -glucane, présent à la fois sous forme libre et associée à la cellule, et conférant un caractère filant aux souches (iii) et enfin d'un homopolysaccharide (de type α -glucane ou β -fructane) produit en présence de saccharose. Si l'ensemble des structures protègent la cellule des contraintes, leur rôle dans la fixation des phages n'est pas élucidé. Toutefois, il a été montré que la souche IOEB277 est sensible à de nombreux phages, dont OE33PA et Vinitor 162 en milieu MRS qui ne contient pas de saccharose. La structure HePS et/ou le glucane pourrai(en)t être donc être impliquée(s). La structure de la paroi et l'existence de rhamnane n'est pas renseignée chez *O. oeni* ([Mahony, 2021](#)).

Pour une revue plus détaillée des interactions hôtes-phages chez *O. oeni*, le lecteur peut se référer à l'article de revue « Phage-host interactions as a driver of population dynamics during wine fermentation : betting on underdogs », publié dans la revue *International Journal of Food Microbiology*, auquel j'ai contribué.

V - 3 Les phages et le biocontrôle dans les aliments

La découverte des phages s'est faite dans un contexte de lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. La phagothérapie a progressivement perdu sa place dans l'arsenal de soins et n'a plus été inscrite au Vidal à partir des années 1970. La prise de conscience mondiale autour de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ATB) a provoqué un regain d'intérêt pour l'isolement de phages, la mise en place de protocoles de soin, leur encadrement technique et légal et enfin la formation des professionnels de soin et du grand public. On peut citer ici le projet Phag-One financé par l'ANR en 2021, et mené par les Hospices Civils de Lyon. Il vise à développer des approches de phagothérapie humaine de traitement des infections à Staphylocoques multi-résistants. Les phages sont également étudiés dans un contexte d'intervention ciblée sur le microbiote intestinal, visant des agents d'infection chronique

comme *Clostridium difficile* (Garvey, 2022).

La lutte contre les bactéries revêt également des enjeux critiques dans le secteur agro-agri, que ce soit lors de la production ou de la transformation des matières premières. Selon la World Health Organization (WHO), la lutte contre les souches multi-résistantes aux ATB fait partie des top-priorités dans les secteurs de production de viandes et de volailles. Les souches problématiques sont des *E. coli* et Salmonelles résistantes à l'ampicilline, la tétracycline, les quinolones et sulfonamides, ainsi que les souches productrices de beta-lactamase et de carbapenemase. D'autres priorités concernent la lutte contre les agents de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) et d'altération des aliments. Ce dernier objectif rejoint les préoccupations de lutte contre le gaspillage alimentaire. La WHO rapporte l'existence de 600 millions de cas annuels de TIAC avec 420 000 décès, et une prévalence de 30% à 40% chez les enfants de moins de 5 ans. Une liste de 31 pathogènes fait l'objet d'une surveillance, parmi lesquels *E. coli*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica* (non typhoïdes) et *Shigella spp.*

Dans les secteurs concernés, la lutte contre les microorganismes indésirables fait largement appel à l'emploi d'agents antimicrobiens, comprenant les désinfectants, les antifongiques et les pesticides. Leur usage est cependant peu compatible avec les enjeux actuels du développement durable, la réduction des intrants et la protection de l'environnement. La recherche d'alternatives plus vertueuses est donc encouragée dans les élevages, les grandes cultures et les enceintes de production des aliments. Elle passe notamment par la formulation d'agents biologiques.

Le marché mondial des biopesticides en cultures est actuellement dominé par des produits à base de *Bacillus thuringiensis*, qui occupent 90% du marché (Kumar *et al.*, 2021). Depuis une dizaine d'années, **un tissu industriel et de recherche se développe et se structure à l'échelle mondiale autour des stratégies basées sur les phages**. Les produits commerciaux obtiennent des premières évaluations positives des autorités. C'est le cas en mai 2021 pour la société Proteon Pharmaceuticals S.A. basée en Pologne, qui obtient auprès de l'EFSA un avis positif pour son additif alimentaire à usage vétérinaire nommé Bafasal, commercialisé en Asie et dans des pays non européens. Le produit est un cocktail de quatre phages virulents actifs contre *Salmonella gallinarum* (Bampidis *et al.*, 2021).

En France, le réseau Phages.fr réunit tous les acteurs académiques et privés. Les sociétés spécialisées dans les traitements par les phages se multiplient sur le territoire national : Vétophage, à Lyon et Phagos, à Grenoble (élevage dont aquaculture) ; Bactolytix, à Montpellier

(Grandes cultures et agro-alimentaire), et enfin Eligo Bioscience et Pherecydes Pharma, Paris (Santé humaine). D'autres industriels comme le groupe Lesaffre choisissent d'agir au travers de la prise de participation dans l'un des leaders mondiaux, Intralytics.

Les verrous sont encore nombreux pour une utilisation élargie dans la chaîne alimentaire avec notamment le risque d'émergence de résistances. La protection de l'activité des particules tout au long du process et les modalités d'introduction dans l'aliment restent des préoccupations et des axes d'amélioration des produits (Fig. 24). De plus dans une saisine de 2014, l'ANSES évoque que leur efficacité serait limitée par la teneur en eau libre dans les aliments et l'état libre ou absorbé du phage. La préoccupation serait que les phages n'aient aucun effet quand ils sont absorbés sur la matrice en cas de recontamination post-traitement par *Listeria*. Mais, une fois désorbés, ils seraient susceptibles de redevenir actifs.

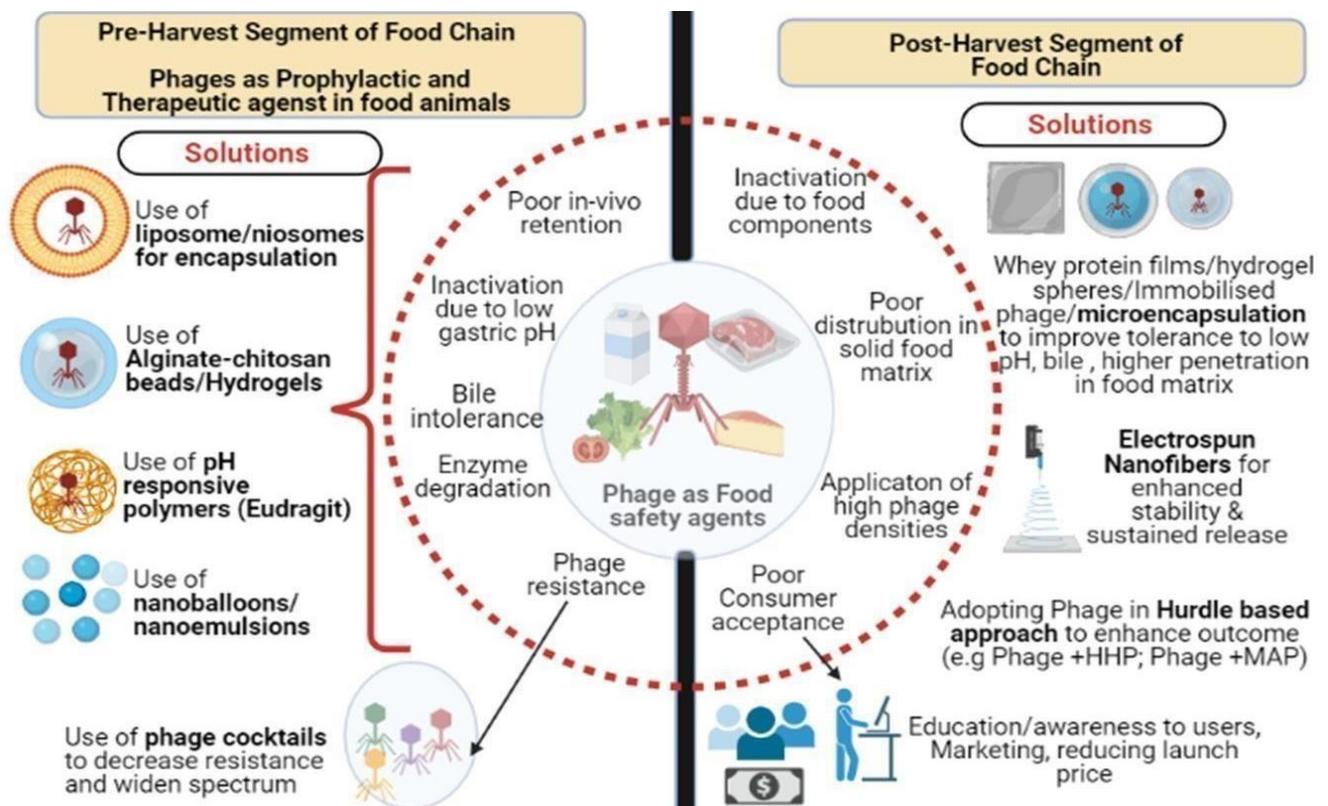


Figure 24 Applications des phages et enzymes dérivées dans le secteur alimentaire (Xu, 2021).

Au niveau législatif, les règlements sont variables selon les pays. Dans le domaine alimentaire, plusieurs autorisations ont été accordées depuis 2006 pour l'utilisation de produits de décontamination des surfaces aux Etats-Unis, mais aussi au Canada ou encore en Nouvelle Zélande (ListexP1000). En Europe, ils peuvent être utilisés comme compléments aux bonnes pratiques d'hygiène. Mais ils ne peuvent pas être considérés comme un moyen d'allonger la durée de vie des aliments ou d'assainir entièrement un produit en cas de contamination.

Une autre solution vise à développer **des enzymes dérivées des endolysines virales**. Elles sont naturellement efficaces contre les bactéries à Gram positives et peuvent cibler quelques souches/espèces dans une population complexe. [Gaeng et al. \(2000\)](#) ont exprimé l'endolysine Ply511 (phage de *L. monocytogenes*) dans une souche de *Lactobacillus spp.* ont observé le biocontrôle du pathogène bactérien dans les produits laitiers fermentés. Les études de [Gervasi et al. \(2014a, 2014b\)](#) ont permis d'exprimer l'endolysine CP25L (amidase d'un phage de *Clostridium perfringens*) chez une souche de *Lactobacillus johnsonii* isolée de volaille. La réalisation de co-cultures s'est accompagnée d'une réduction de 2.6 log CFU/mL de la population de *C. perfringens*.

Après ingénierie, ces enzymes peuvent également cibler des bactéries à Gram négatives. Il s'agit de créer des protéines chimériques, en conservant l'extrémité C-terminale catalytique des endolysines, et en leur ajoutant une extrémité N-terminale capable de déstabiliser la membrane externe des bactéries ([Briers et al., 2014](#)). C'est la stratégie suivie par la société belge Lysando.

Matériels et Méthodes

I Bactéries : conditions de culture, identification et conservation

I - 1 Bactéries utilisées

Un ensemble de 35 souches d'*O. oeni* isolées à partir de vins rouges ou blancs ont été utilisées. Quelques souches du panel sont exploitées commercialement comme levains de fermentation malo- lactique. La liste a été complétée avec des souches d'autres espèces du genre *Oenococcus*, disponibles dans le Centre de Ressources Biologiques œnologiques (CRB Oeno, ISVV, Villenave d'Ornon, France). Il s'agit de souches de l'espèce *O. kitaharae* issues de Shochu, et de *O. alcoholitolerans* (fournies par le Prof. de Morais, UFP, Santa Catarina, Brésil). La souche *O. sicerae* UCMA15228 a été obtenue de la collection DSM.

Le **Tableau VI** rassemble l'origine des souches, et dans le cas des souches de *O. oeni*, l'appartenance aux groupes phylogénétiques et le statut lysogène.

Tableau VI Liste des souches bactériennes utilisées

Espèce	Name	phylogroup	Prophage	Origine
<i>O. oeni</i>	IOEB S277	A	aucun	Levain BioLaffort, F
	Sarco 15	A	aucun	Vin rouge, F
	Sarco 19	A	aucun	Vin rouge, F
	Sarco 25	A	aucun	Vin rouge, F
	IOEB 0205	A	Int _A	F
	IOEB 0608	A	Int _A	Vin, F
	IOEB L26-1	A	Int _A	Vin, F
	IOEB1491	A	Int _A	Vin rouge, F
	Microenos B1	A	Int _B	Levain
	IOEB B10	A	Int _B	F
	S28	A	Int _A et Int _C	Laffort, F
	IOEB Ciné	A	Int _A et Int _C	Starter CHR Hansen
	Sarco 11	A	Int _D	Vin blanc effervescent, F
	IOEB 8413	B	aucun	Non communiqué
	IOEB 0502	B	aucun	F
	Sarco S12	B	aucun	Vin blanc, F
	Sarco S13	B	Int _D	Vin rouge, F
	IOEB9803	B	Int _D	Vin rouge, F
	IOEB 8417	B	Int _D	Vin rouge, F
	IOEB 9805	B	Int _D	Vin rouge, F
	IOEB C28	B	aucun	Cidre, Bretagne F
	IOEB C23	B	Int _B	Cidre, Normandie F
	IOEB C52	C	aucun	Cidre
	CRBO 1381	C	aucun	Cidre
	CRBO 1384	C	Int _E	Cidre

<i>O. kitaharae</i>	BL29 new	D	non	Kombucha, cette étude
	BL12	D	Int _F	Kombucha, cette étude
	BL20	D	Int _F	Kombucha, cette étude
	BL4	D	Int _F	Kombucha, cette étude
	NRIC0647 ^T	na	aucun	Résidus de Shochu, Japon
	Y4.1	na	aucun	Kéfir de figue, cette étude
<i>O. alcoholitolerans</i>	CRBO2176	na	aucun	Kéfir de figues, cette étude
	JP736	na	aucun	Production de bioéthanol, Br
	JP72/2	na	aucun	Production de bioéthanol, Br
<i>O. sicerae</i>	UCMA15228 ^T	na		Cidre (DSM)

na, non applicable ; F, France, J, Japon, Br, Brésil.

I - 2 Conditions de culture et de conservation

Les souches sont cultivées en bouillon MRS « Man, Rogosa, Sharpe » (Difco). La forme déshydratée commerciale contient 10 g/L de bactopeptone, 8 g/L d'extrait de boeuf, 4 g/L d'extrait de levures, 20 g/L de glucose, 2 g/L de trisodium citrate, 5 g/L d'acétate de sodium, 2 g/L de KH₂PO₄, 0,2 g/L de MgSO₄, 0,1 g/L de MnSO₄ et enfin 1ml/L de Tween 80, Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée d'acide orthophosphorique. Pour les souches d'*O. kitaharae* la valeur est ajustée à 6.

Alternativement, le milieu « jus de raisin rouge » a été utilisé. La préparation d'un litre de bouillon nécessite 250 mL de jus de raisin rouge commercial, 5 g d'extrait de levures et 1 mL de Tween80, Le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution concentrée (5N) de NaOH.

Pour obtenir des milieux gélosés, 25 g/L d'agar sont ajoutés aux milieux.

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage de 15 minutes à 121°C avant leur utilisation.

Les cultures sont incubées à 25°C en conditions anaérobies.

Pour la conservation des souches, les cultures sont additionnées de 30 % (v/v) de glycérol stérile, homogénéisées et stockées à -20°C ou à -80 °C.

I - 3 Suivi de la croissance bactérienne

I - 3 - 1 Par spectrophotométrie

La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1280, Shimadzu). Une valeur de 1 représente une concentration de 2 x10⁹ UFC/mL (unité formant colonie/mL) en milieu MRS chez *O. oeni*.

Des cinétiques de croissance ont été suivies en microplaque de 96 puits, dans un volume de 200

μL (Synergy HTX Plate Reader; BIO-TEK®).

I - 3 - 2 Dénombrement sur milieu gélosé

Le dénombrement est réalisé sur milieu gélosé JR à pH 4,8, qui permet une croissance plus rapide des colonies que sur milieu MRS. L'échantillon est dilué en cascade dans de l'eau physiologique stérile (9 g/L de NaCl). Un volume de 100 μL de chaque dilution est ensemencé en surface à l'aide d'un râteau ou de billes stériles. Après une incubation de 7 à 10 jours, les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 sont choisies pour le calcul de la concentration bactérienne, qui est exprimée en unité formant colonies par ml (UFC/mL), selon la formule $N = (n \times 10) \times 1/c$ [n est le nombre de colonies/ c est le coefficient de dilution].

Une technique plus rapide et moins onéreuse a été utilisée lorsque de nombreuses modalités étaient mises en œuvre. Dans ces cas, des spots de 10 μL de chaque dilution décimale ont été déposés sur gélose JR. Après incubation, les dilutions permettant de dénombrer entre 3 et 20 colonies ont été utilisées pour le calcul la concentration bactérienne, selon la formule $N = (n \times 100) \times 1/$ (UFC/mL). La limite de détection dans ce cas augmente de 10 à 100 UFC/mL.

I - 4 Identification par MALDI-TOF

La spectrométrie de masse (matrix-assisted laser desorption/ionization-Time Of Flight) est une technique analytique qui permet une identification rapide, fiable et à faible coût des micro-organismes (bactérie ou levure). Elle permet l'identification simultanée de plus de 90 isolats en environ une heure.

L'analyse nécessite l'utilisation d'une base de données spectrale qui contient des empreintes digitales de masse peptidique des souches types de genres/espèces/sous-espèces/souches spécifiques rencontrées dans l'environnement œnologique (Petri *et al.*, 2015; Vallet-Courbin *et al.*, 2022). L'identification est limitée aux espèces répertoriées dans cette base.

Les colonies bactériennes sont isolées sur milieu de JR agar pH 4,8 puis déposées sur une cible appropriée. La cible est placée dans le spectromètre de masse (MALDI-TOF Biotyper Microflex LT- Bruker®) et analysée. Chaque colonie est irradiée avec un faisceau laser afin de détruire les cellules, dégrader leurs protéines en polypeptides et les ioniser pour analyse dans le spectromètre de masse. L'ensemble des polypeptides pour chaque colonie produit un spectre protéique spécifique similaire à celui d'une espèce de levure ou de bactérie. Le spectre obtenu est comparé à ceux répertoriés dans la base de données (cette étape dure environ une heure).

Les résultats sont classés en : identification satisfaisante lorsqu'il existe une homologie entre le spectre de la colonie ciblé et l'un des espèces repères ; ou non identifiable lorsque la colonie appartient à une espèce absente de la base de données ou présente dans la base mais avec une espèce de référence trop éloignée de l'environnement d'origine de l'isolat.

II Interactions hôtes-phages

II - 1 Préparation de stocks concentrés à partir de lysats purs

II - 1 - 1 En milieu solide

Les différents stocks phagiques conservés à 4°C sont titrés en double couche en présence de la souche sensible. La dilution qui permet d'obtenir une lyse confluyente est identifiée et elle est utilisée pour préparer dix boîtes identiques. Après incubation, les géloses molles sont raclées à l'aide d'une spatule stérile, réunies et centrifugées à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant est ensuite filtré sur membrane PES 0,22 µm. Cette technique permet d'obtenir des lysats concentrés dont la concentration varie entre 10⁶ à 10¹⁰ UFP/mL.

II - 1 - 2 En milieu Liquide

Une culture de la souche IOEBS277 est préparée dans un volume de 50 mL de bouillon MRS. Lorsque la DO de 0,05-0,1 est atteint, elle est divisée en deux (essai et témoin). L'essai est infecté avec un volume minimal de suspension phagique de façon à générer une Multiplicité Optimale d'Infection (MOI) de 1/300. Les échantillons sont incubés à 25°C pendant 72 h à 96 h et la croissance est suivie par inspection visuelle des deux cultures. La culture lysée est centrifugée 5 min à 5000 g et filtrée (0,22 µm). Cette technique permet de rapidement obtenir un lysat concentré en phages.

II - 2 Préparation de lysats après induction de souches lysogènes

Les cultures sont induites en présence de mitomycine C (MC), issue de la bactérie *Streptomyces caespitosus*. Cette molécule induit des dommages sur l'ADN bactérien (Otsuji *et al.*, 1959), ce qui déclenche le système de réparation SOS de l'ADN. L'activation de la protéine RecA provoque le clivage du répresseur prophagique et entraîne un cycle lytique (Michael *et al.*, 1983). Les cultures en début de phase exponentielle (DO₆₀₀ = 0,05 à 0,3) ont été additionnées de MC (0,5 ou 1 µg/mL) et un témoin sans inducteur a été préparé en parallèle. Les cultures sont incubées

à l'obscurité à 25°C et la DO est suivi pendant environ 48 heures de culture. L'initiation du cycle lytique après induction de prophage se traduit par une lyse cellulaire. Les échantillons lysés sont collectés et centrifugés (6 min à 5000 g) et le lysat filtré.

II - 3 Dénombrement de phages infectant le genre *Oenococcus*

La technique reconnue pour la titration de particules virales est dite de la double couche (Adams, 1959; Bradley, 1965; Kurtböke, 2012). Pour la mettre en œuvre, on utilise un milieu MRS solide additionné de CaCl₂ 16 mM et de MgSO₄ 15 mM. La présence de cations favorise la première étape d'infection des virus, qui est l'adsorption sur l'enveloppe de la bactérie hôte. La gélose prend le nom de MRSφ. Ce milieu est préparé à deux concentrations finales en agar : Un premier milieu à 20 g/L d'agar est réparti dans des boîtes de Petri. Une base semi-solide (8 g/L) est répartie à raison de 5 mL par tube et conservée en surfusion à 55°C après autoclavage.

Le lysat à titrer est filtré sur membrane 0,22 μm (PES) puis dilué en cascade en tampon phage (Tris 0,01M pH 7.5; MgSO₄ 0,01M; NaCl 4 g/L. Un tube de gélose molle est additionné de 100 μL de suspension phagique et de 200 μL d'une culture bactérienne sensible (à DO_{600nm}= 0,2 – 0,3). L'ensemble est immédiatement coulé à la surface d'une gélose MRS. Les boîtes sont incubées à 25°C, et les plages de lyse sont observables après 4 à 7 jours.

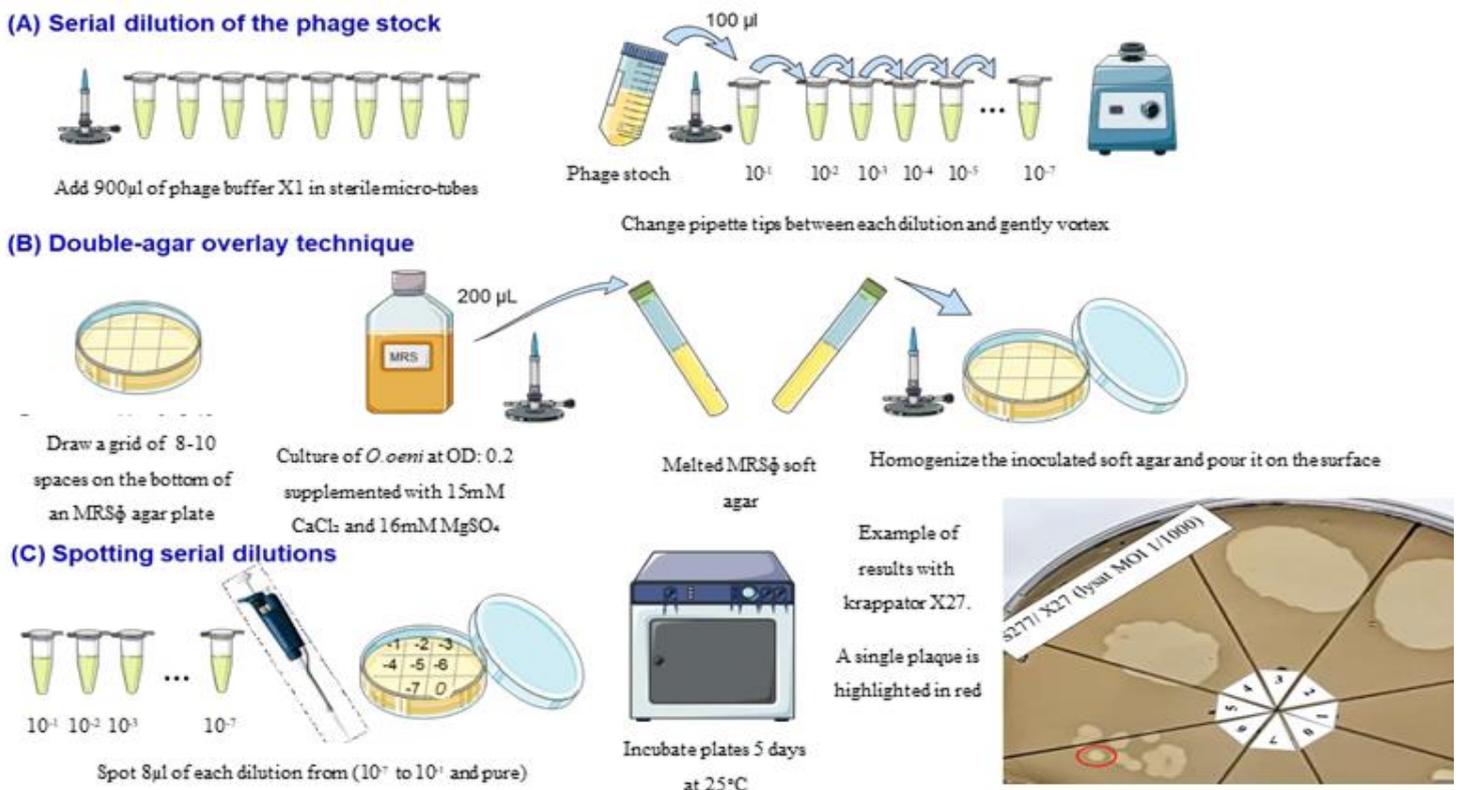


Figure 25 Représentation de la méthodologie suivie pour évaluer la concentration des surnageant de culture en phages (technique de la double-couche) adaptée de Chaïb (2021)

La méthode alternative est représentée **Fig. 25** et consiste à inoculer uniquement la souche sensible dans la gélose molle et de la répartir sur la gélose dure. Après solidification, les différentes dilutions de lysat phagique sont déposées à la surface de la gélose sous la forme de gouttes de 8 µl. La dilution présentant un nombre de plages de lyse compris entre 5 et 25 est retenue pour déterminer la concentration en phages, selon la formule : $N = (n / 0,008) \times 1/c$; où n est le nombre de plages de lyse et c le coefficient de dilution. L'avantage de cette approche est d'être plus économe en milieux, car elle permet de tester la totalité de la gamme de dilutions d'un échantillon donné (pur à 10^{-7}) sur la même boîte. Son inconvénient est de présenter un seuil réduit à 125 UFP/mL.

II - 4 Mise en conservation de bactériophages

Les lysats phagiques de travail sont conservés à 4°C, pour une utilisation immédiate. Pour une conservation plus longue, les lysats sont additionnés de 15% de glycérol et congelés à -20°C ou à -80 °C. Une autre méthode consiste à infecter une culture et à récupérer les cellules après 24 h avant de contact. Du glycérol 80% stérile est ajouté (15% final) puis le mélange est homogénéisé avant stockage au congélateur.

II - 5 Observation en microscopie électronique MET

Un volume de 25 mL d'un lysat phagique concentré (proche de 10^9 UFP/mL) est filtré extemporanément sur membrane PES de 0,22 µm. L'échantillon est alors traité à la DNase et à la RNase (1 µg/mL), et incubé à 37°C pendant 30 min. Cette étape est suivie par l'ajout de NaCl 1 M, puis de Poly Ethylène Glycol (PEG 6000 ; 10 % p/v) sous agitation modérée, jusqu'à dissolution complète. La suspension visqueuse obtenue est répartie dans des pots de centrifugation préalablement refroidis à 4°C pendant 12 h au minimum afin de permettre la précipitation des particules virales. Les bactériophages sont récupérés par centrifugation (11000 g ; 10 min) à 4° C. Le surnageant est éliminé. Le culot est séché et soigneusement repris dans un minimum de tampon TM (50 mM Tris-HCl pH 7,4; MgSO₄ 10 mM). Après 30 minutes de contact, le culot est remis en suspension soigneusement par une série d'aspirations-refoulements doux. Deux lavages successifs sont appliqués en utilisant un mélange chloroforme/alcool iso-amylque (24:1) (v/v). L'observation des particules virales a été réalisée au Centre de Microscopie de l'Université de Bordeaux (Bordeaux Imaging Center – CNRS UMS 3420) sur un microscope électronique à transmission Hitachi H7650 à 80 kV en haute

résolution.

II - 6 Spectre de résistance

Le spectre d'hôte d'un phage donné est déterminé en titrant le lysat phagique en parallèle sur la souche de propagation utilisée pour confectionner le stock, et sur les souches dont le spectre doit être évalué. Le rapport de concentrations obtenu est appelé EOP « efficiency of plating ». Les résultats obtenus sont analysés comme suit : un rapport proche de 1 indique que la souche testée propage aussi bien le virus que la souche de propagation ; un rapport supérieur à > 1 indique que la souche testée propage mieux le phage que la souche de propagation. Dans ces deux premiers cas, la souche testée est dite sensible ou encore permissive. *A contrario*, un rapport nettement inférieur à 1 démontre une résistance de la souche testée au phage.

II - 7 Capacité d'adsorption du phage sur une souche sensible

Un volume de 5 mL d'une culture en bouillon MRS (DO600 de 0,2) est centrifugé (5000 *g*, 6 min). Le culot est récupéré et remis en suspension dans 4,5 mL de MRS ϕ . Le lysat phagique est préalablement ramené à température ambiante sur la paillasse et ajouté aux cellules de façon à créer un rapport initial de 1 phage pour 300 bactéries. Ceci représente à ce stade une quantité de phages proche de 10^6 UFP dans l'essai. Le mélange est réparti immédiatement dans des microtubes, à raison de 1 ml par tube, et ces derniers sont placés à 25°C. Un tube est prélevé à intervalles réguliers (0', 20', 40', 60', 80', 100'). Son contenu est filtré, et le culot contenant les phages adsorbés aux cellules est ainsi éliminé. Les phages libres dans le surnageant (non adsorbés aux cellules) sont dénombrés par la technique de la double couche. Les résultats sont exprimés en pourcentage de phages adsorbés par rapport à la quantité initiale introduite en fonction du temps.

II - 8 One step growth :

Le degré de virulence d'un phage donné est caractérisé par une période de latence et la quantité de virions libérés pour chaque cellule infectée (nommée Burst-Size). Ces deux paramètres sont déterminés par un test de « One step growth ».

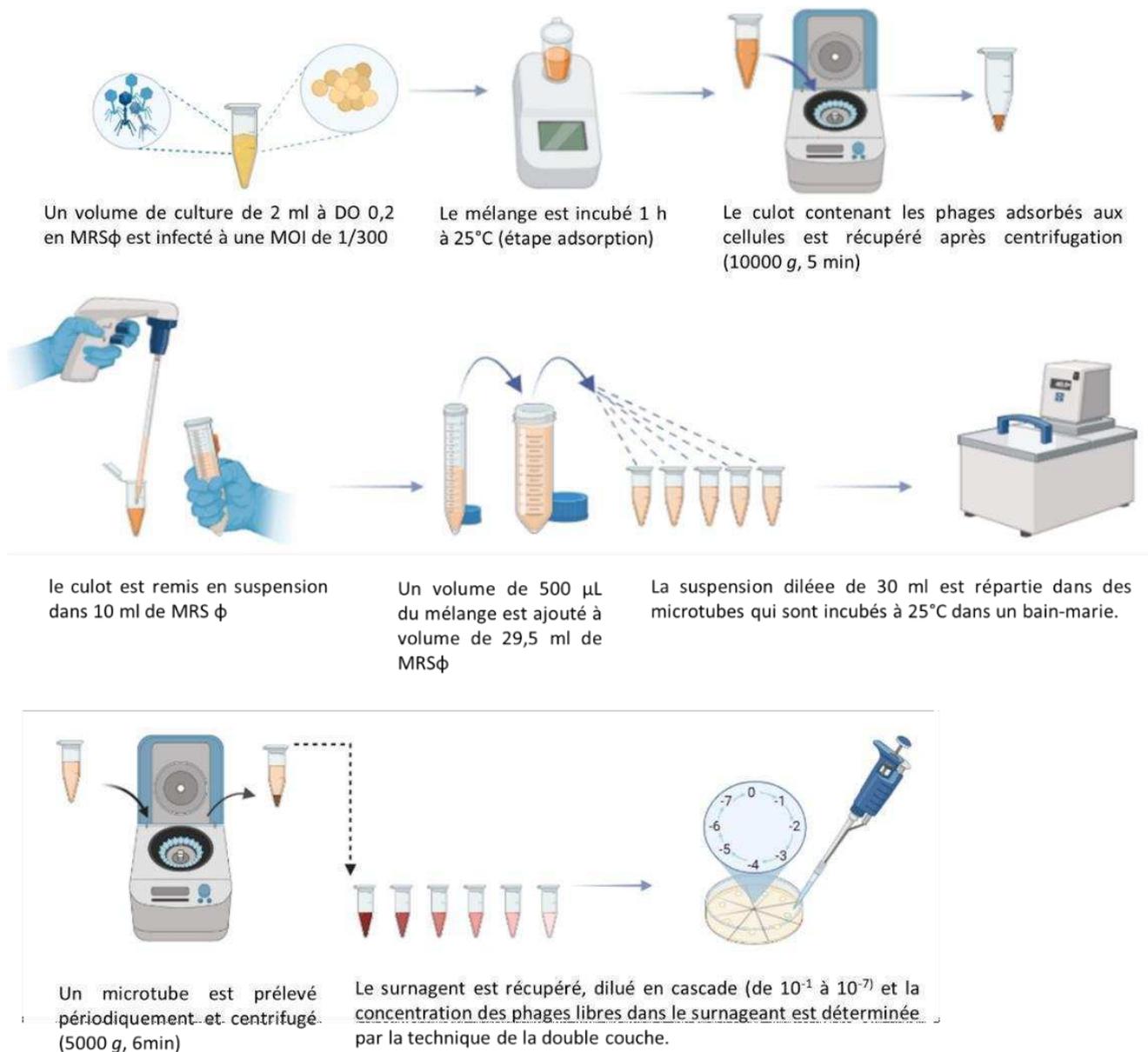


Figure 26 Les différentes étapes du protocole de "one-step-growth".

Pour ce faire, les cellules (2 ml de culture en MRS à DO 0,2 ; ou 1 ml à DO 0,4) sont centrifugées et le culot est repris dans 1,8 mL de MRS ϕ . Le phage est ajouté pour obtenir une MOI de 1/300, et le volume est complété à 2 mL avec du bouillon MRS ϕ . Après une heure d'incubation à 25°C, le mélange est centrifugé (10000 g, 5 min) et le culot est remis en suspension dans 10 ml de MRS ϕ . Un volume de 500 μ L de ce mélange est prélevé et ajouté à un volume de 29,5 ml de MRS ϕ . Ces dilutions successives ont pour but de diluer les phages libres, non adsorbés, en tout début d'expérience.

Le mélange de 30 mL est réparti à raison de 1,5 mL par microtube, et les aliquotes sont placées à 25°C dans un bain-marie. Un tube est prélevé toutes les heures, centrifugé (5000 g, 6min) et la concentration des phages libres dans le surnageant est déterminée par la technique de

la double couche. Le détail des étapes est représenté **Fig. 26**.

Les résultats sont affichés sous la forme d'une courbe représentant la quantité de phages produits dans le surnageant (UFP/mL) en fonction du temps (heures). A partir de cette dernière on peut déduire la valeur de "burst size" (qui est définie comme le rapport entre la quantité de phages nouvellement formés à la fin du cycle et la quantité de phages présents en début de cycle) ainsi que le temps de latence nécessaire avant la libération des nouveaux virions dans le milieu extérieur.

II - 9 Sélection de mutants insensibles au phage lytiques (BIMs)

La souche sensible BL4 à DO 0,05 est infectée par le phage virulent Krappator X27 à une MOI de 1/300 en bouillon MRS. Un témoin non infecté est réalisé en parallèle. Après 72 heures d'incubation à 25°C, une inspection visuelle est réalisée afin de confirmer la lyse complète de l'essai par rapport au témoin. L'incubation est prolongée jusqu'à reprise de la croissance, qui traduit l'émergence de mutants insensibles aux phages (Bacterial Insensitive Mutants, ou BIMs), majoritairement affectés dans la paroi.

Lorsque la DO atteint la valeur de 1, la culture infectée est isolée sur milieu JR gélosé. Les colonies sont soumises à des repiquages successifs. Une colonie est sélectionnée et soumise à une deuxième infection selon les mêmes modalités. Les colonies isolées sont testées sur deux paramètres:

- la résistance au phage de challenge,
- l'absence de phages dans le surnageant de culture.

III Biologie moléculaire et outils d'analyses bio-informatique

III - 1 Extraction d'ADN génomique bactérien :

III - 1 - 1 Extraction d'ADN génomique

Une culture bactérienne concentrée (1,5 ml à DO₆₀₀ 1) est centrifugée (5 min à 10000 g). Le culot cellulaire obtenu est lavé 3 fois en TE (pH 8), puis mis en suspension dans 600 µL d'une solution EDTA (50 mM, pH 8) contenant 10 mg/mL de lysozyme. L'échantillon est incubé 1 h à 37°C. Les protoplastes sont récupérés par centrifugation (10000 g, 2 min) et repris dans un volume de 600 µL de solution de lyse « Nuclei Lysis solution ». La suspension est incubée à

80°C pendant 5 min pour optimiser la lyse des protoplastes et la libération des acides nucléiques. Les protéines et autres débris cellulaires sont précipités en ajoutant 200 µL de solution de précipitation « protein precipitation solution ». Le mélange est alors homogénéisé au vortex pendant 20 secs. L'échantillon est refroidi 5 min dans la glace, puis centrifugé à 10000 g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau micro-tube contenant 600 µL d'isopropanol et la précipitation de l'ADN s'obtient en réalisant plusieurs inversions du tube. Après centrifugation (10000 g, 5 min), le culot est lavé deux fois avec 600 µL d'éthanol à 70%, séché puis repris dans 50 µL d'eau ultra pure « DNase & RNase Free water » (ThermoFisher). Cette suspension est traitée à la RNase (3 µL de la solution concentrée est ajoutée à 50 µL de suspension) et incubée à 37 °C pendant 30 min. Ensuite l'ADN est réhydraté pendant une nuit à 4°C avant d'être utilisé ou stocké à -20 °C pour une utilisation ultérieure. Le dosage d'ADN dans les extraits est obtenu à l'aide du « BioSpec-Nano (Shimadzu®).

III - 1 - 2 Extraction sur carte FTA® CloneSaver™ :

Les cartes FTA® CloneSaver™ (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) sont constituées d'une membrane traitée chimiquement permettant la lyse cellulaire après une heure de séchage à température ambiante. L'ADN de haut poids moléculaire reste alors immobilisé dans la matrice. Chaque carte peut accueillir 96 échantillons.

Une colonie bactérienne est mise en suspension dans 50 µL d'eau milli-Q et un volume de 8 µL est déposé sur une zone circulaire matérialisée sur la carte. Elle contient un indicateur qui passe du rose au blanc lorsque l'échantillon est déposé. La carte est séchée 1 h à température ambiante. Elle se conserve à long terme à température ambiante et à l'obscurité. Elle permet de réaliser plusieurs réactions de PCR de contrôle à partir de chaque ADN déposé.

III - 2 Extraction d'ADN génomique phagique

Un volume de 25 mL d'un lysat concentré ($\geq 10^8$ UFP/mL) est utilisé pour l'extraction d'ADN phagique. Les particules phagiques sont précipitées par ajout de PEG en présence de NaCl. Après centrifugation, le culot obtenu contenant les particules virales est mis en suspension dans 500 µL de tampon TM, et traité à la DNase (1mg/mL) et la RNase (1mg/mL). Après centrifugation (13000 g, 5 min), le surnageant est récupéré, additionné de protéinase K (50 µg/mL), d'EDTA (20 mM) et de SDS (0,5 %) puis incubé 15 min à 65°C (dans un bain marie). La précipitation des protéines est obtenue par ajout de KCl 0,5 M, suivie d'une incubation de 30

min à 4°C. Après centrifugation (13000 g, 15 min), le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Deux extractions successives (v/v) sont réalisées par les mélanges phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) puis chloroforme alcoolisoamylique (24:1).Après centrifugation, (10 min à 13000 g), l'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu et incubé 30 min dans la glace. Après une centrifugation de 30 min à 13000 g, le culot d'ADN est lavé par 200 µL d'éthanol 70 %, puis centrifugé 15 min à 13000 g. Cette dernière étape est répétée deux fois. Le surnageant est éliminé, et le culot est séché pendant 10 min. Il est repris dans 50 µL d'eau «DNase & RNase Free water (ThermoFisher®).

III - 3 Amplifications d'ADN par PCR

La matrice utilisée en PCR peut être : (i) de l'ADN génomique bactérien ou phagique à 25 ng/µl (1 ng par réaction) (ii) un prélèvement d'une pastille de membrane FTA effectué à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Micro-Punch™ 1.2 mm), lavé dans 200 µL de tampon Tris-EDTA (Tris 10 mM pH 8, EDTA 2,5 mM) puis dans 200 µL d'eau milli-Q, (iii) un lysat phagique concentré (minimum 10³ UFP par réaction).

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 20 à 25 µL. Le kit Taq 5x Master Mix® (New England, Biolabs, Evry, France), et 0,2 µM de chaque amorce sont ajoutés au mélange réactionnel. Un thermocycleur i-Cycler (Biorad®) est utilisé pour les réactions d'amplification. Celles-ci se déroulent en 30 cycles, constitués d'une étape de dénaturation de 30 sec à 95°C, une étape d'hybridation des amorces pendant 30 sec à une température comprise entre 50 et 60°C (selon le T_m de couples amorces), et une étape d'élongation à 68°C (1 min/1 kb).

Le design des différents couples d'amorces est réalisé avec le logiciel Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) ou sur SnapGene (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>). Leur synthèse est effectuée par la société Eurofins Genomics.

La liste des amorces utilisées lors de cette étude est présentée dans le **Tableau VII**.

Tableau VII Liste des amorces utilisées.

Gène/région amplifiée	Amorces (nom et séquence 5' - 3')		Amplicon (pb)	Référence	
Identification bactérienne					
16S	16S F	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCTGCC	1500	Divol <i>et al.</i> , 2003	
	16S R	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTGATCCTGGCTCAG			
Identification de l'espèce <i>O. oeni</i>					
mle _{oeni}	Oo1	GTGCCGCTTTTTGGATATTA	430	Divol <i>et al.</i> , 2003	
	Oo2	AGCAATTTTATCTTTATAGCT			
Typage d'<i>O. oeni</i>					
ORF P1pE-like	TR1_f	GGTAAGGGAAAAGTTATCCTCG	268	Claisse et Lonvaud-Funel, 2012; 2014	
	TR1_r	GTTTTACCTTCGGTCGAGC			
ORF kinase	TR2_f	CATAATAGAATTCACCTTCGCTTACC	563		
	TR2_r	GTAGCTGGTACGAGCTCTTC			
Identification de l'espèce <i>O. kitaharae</i>					
mle _{kita}	mle _{kita} F	TGATCAAAACTTCGCTTGGGTT	676	Cette étude	
	mle _{kita} R	RACAACAAAAACAAGCTCT			
Détection de la lysogénie chez <i>O. oeni</i> (attB vides)					
AttB A vide	AttB A F	CTCCATGGTCAAGTGCTAAG	145	Jaomanjaka, 2014	
	AttB A R	AAAGCATCCACCCTTAATTGG			
AttB B vide	AttB B F	CTTTAGGCTTTGTTCTGTTGA	730		
	AttB B R	AAAATTTATGGGCCATTTCGT			
AttB C vide	AttB C F	AGCAATGCCCTTTAACTCA	337		
	AttB C R	TTGCGCTATACGCACCATAG			
AttB D vide	AttB D F	AGGGAGGGTCCCATAGTTCTT	782		Claisse <i>et al.</i> , 2021
	AttB D R	TGATAGCATCCGTTGTACTC			
AttB E vide	AttB E F	AACGAATGTTCCGTGATGT	434		
	AttB E R	TGACTAATTTGACTTGATTGTTGTTG			
AttB F vide	AttB F F	CTTGGCTATGCTACGGCTTC	689		
	AttB F R	TCGTCAGGGCTTTTAGGAGA			
Détection des prophages					
Signature des gènes <i>int</i> (intégrase)					
type A	Int A F	CGAAGTTTTGACTGGAAAAGAAA	273	Jaomanjaka, 2014	
	Int A R	TTGAGCGAAGCTGCTATAAGAAC			
type B	Int B F	AGTTACCACCAAAGGCCATAAAC	443		
	Int B R	GCTCTGACGACTTACCAGCTTTA			
type C	Int C F	GGCTATGACGCAGGGCGTGG	426		
	Int C R	TGACGGGACGTGCTGGCAAG			
type D	Int D F	CGGAAAATATTATCAAGCAGGAG	343		
	Int D R	TTCAGCGTGATCTTTACCAAAAT			
type E	Int E F	GATTTTTTGCCGTAAAGGGTG	483	Chaïb <i>et al.</i> , 2022	
	Int E R	CGCAGGTATTCATGAGGATTC			
type F	Int F F	GATAGCAACACTGGAATGCC	255		
	Int F R	GCTATGGACGTTATGGCAA			
Signatures des prophages à l'état intégré jonctions <i>attL</i> des prophages					
attL _E	AttB E F	AACGAATGTTCCGTGATGT	591	Chaïb <i>et al.</i> , 2022	
	AttB E R2	CGTTTCAGACGGTGCCTTA			
attL _F	AttB F F	CTTGGCTATGCTACGGCTTC	861	Claisse <i>et al.</i> , 2021	
	AttB F R1	GGGCATTCCAGTGTTGCTAT			
Présence d'îlots PR intégrés					
PRC (attL)	attB reg1F	TACGAAGATGGTATTAAGCGGTTA	685	Jaomanjaka, 2014	
	AttB2r	TTGCGCTATACGCACCATAG			
PRD1 (attR)	attRPRD F	TGCTGCCAGCTAATAGCAAA	856		
	attRPRD R	CAAGCAGTTCGTCCTTTTT			
PR F1 (attL)	attBF F	CTTGGCTATGCTACGGCTTC	880		
	attLPRF2 _{nw} R	TTGGCCAATAACGTTTTCAATGC			
	attB _F F	CTTGGCTATGCTACGGCTTC			

PR F2 (attL)	attBF R3	CACGCTTTAAGGCACACTCA	913	Claisse <i>et al.</i> , 2021
PR G (attL)	attB _{PRG} F	CCCAATGGCTTTGGATAGAA	1341	Jaomanjaka, 2014
	attL _{PRG} R	AGGCCATAATGATGTGCATACT		
PR H1 (attL)	lIot H1f	TTGCAGTATCAGCTAGGCCA	228	
	attBH R	CTTGACCTGCCAACGTCATT		
PR H2 (attL)	lIot H2f	ACGCCGAAGTAACTAGTAAACAG	179	
	attBH R	CTTGACCTGCCAACGTCATT		
PR I1 (attL)	lIot I ₁ F	ACCTATGCCACTTTAGCCGT	285	
	attB _i R	CTAATGTGCTTTGCCAAACGT		
PR I2 (attL)	lIot I2f	CTATGCGACTTTGGCTGTCC	283	
	attB _i R	CTAATGTGCTTTGCCAAACGT		
Typage des oenophages virulents				
Vinitor 162	TMP F2	ATTCGCTCACAGGGGCAAAA	671	Philippe <i>et al.</i> , 2021
	TMP R2	CCAAATTAGCAGTTGTCATTGTGCC		
Krappator X27	TMP X f	TAGAAACATATACGGCACAGCC	439	Cette étude
	TMP X R	TCTAGAACCTTGTCAAAGCGT		
Loci CrispR <i>O. kitaharae</i>				
CRISPR chez CRBO2176	Kicri3-F	TGATCAAAAACCTCGCTTGGGTT	580	Cette étude
	Kicri3-R	ACGCACAACAAAAACAAGCTCT		
CRISPR chez DSM_17330	CrispR2K-F	TATGGGCCAAACCAATCAAT	4296	Cette étude
	CrispR2K-R	ATTGTTAGCAGCAGCCCATCCAC		
O _{kita} CrispRF	O _{kita} CrispRF	CCAAAATTGATCTCACTGAAC	3921	Cette étude
	O _{kita} CrispR R	ATCTGAGCCACAAGCACA AAA		

III - 4 Typage par MLVA des souches de l'espèce *O. oeni*

Le typage par MLVA consiste à amplifier par PCR des séquences répétées à des périodes variables au sein du génome d'un organisme (VNTR). Plusieurs régions peuvent être ciblées et leur taille et le nombre de répétitions sont propres à chaque souche d'une espèce donnée.

Chez *O. oeni*, le schéma cible 5 régions (Claisse et Lonvaud 2014). Mais une variante rapide de typage des souches isolées de l'espèce *O. oeni* peut être réalisée par amplification et séparation en électrophorèse capillaires (MultiNA, Shimadzu) des régions TR1 et TR2 (Claisse *et al* Lonvaud-Funel, 2012) (Tab. VII). Pour chaque échantillon à analyser, une réaction de PCR multiplex est réalisée en présence des 4 amorces marquées par un fluorochrome distinct (5 pmol respectivement).

III - 5 Migration d'acides nucléiques par électrophorèse

III - 5 - 1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les gels ont été préparés avec une concentration en agarose variant de 0,8 à 1,2 % p/v) en tampon TAE 1X (TAE 50X : Tris 2 M, Acétate 1 M, EDTA 50 mM pH 8). Le gel est additionné d'un agentintercalant « le bromure d'éthidium » à 0,2 µg/ml. Après polymérisation, le gel est déplacé dans une cuve de migration remplie de TAE 1X. Avant dépôt, les échantillons sont additionnés de 10 % v/v de bleu de charge (glycérol 50 %, TE 50 %, bleu de bromophénol 0,25

%). Le témoin de poids moléculaire est le 2 Log DNA ladder 0,1-10 kb (New England Biolabs®). La migration est réalisée sous un voltage constant (110 V) pendant 45 min à 60 min. Les profils de la migration obtenus sont visualisés par exposition à la lumière UV, grâce au système d'imagerie Infinity Capt (Fischer Scientific®, Bioblock).

III - 5 - 2 Electrophorèse capillaire à puce MultiNA

Le système (Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis, Shimadzu®), permet l'analyse rapide de très petits volumes (<1 µL) et d'un grand nombre de produits d'amplification. Le principe de ce système d'électrophorèse capillaire est similaire à celui de l'électrophorèse classique sur gel d'agarose. Son avantage repose sur l'automatisation de la migration, et la visualisation des échantillons marqués avec un fluorochrome. Le kit MultiNA DNA 1000 (Shimadzu) est prêt à l'emploi. Il se compose d'un tampon de séparation spécifique des fragments de 65 à 1371 pb et d'un calibrateur, qui sont ajoutés à chaque échantillon lors de l'analyse. Le fluorochrome SYBR Gold® X10000 (Invitrogen®) est ajouté à une concentration finale 1X dans le tampon de migration. Le marqueur de poids moléculaires utilisé est le phiX174-HaeIII digest (Promega) qui est dilué 50 fois dans du TE pH 8.

Le logiciel « MultiNA control » permet le lancement de l'analyse, et indique toutes les quantités de réactifs nécessaires pour une quantité définie d'échantillons. Enfin le logiciel " MultiNA Viewer " est utilisé pour visualiser et analyser des résultats sous forme de pics sur un électrophorégramme, et sous forme de bandes dans une image numérique du gel.

IV Outils bio-informatiques

Le SEED et l'annotation rapide des génomes microbiens à l'aide de la technologie des sous-systèmes (RAST) ont été utilisées (Aziz *et al.*, 2008; Overbeek *et al.*, 2014) ainsi que le RASTtk annotation pipeline (une implémentation modulaire et extensible de l'algorithme RAST pour la construction de pipelines d'annotation personnalisés et l'annotation de lots de génomes) (Brettin *et al.*, 2015). Le programme PhiSpy, intégré sous RAST, a permis la détection des prophages (Akhter *et al.*, 2012). Les programmes Finder et Prophinder (Lima-Mendez *et al.*, 2008) ont permis de détecter les séquences d'origines virales grâce à des comparaisons avec des bases de données rassemblant des gènes de phages ou de prophages connus et accessibles (la base de données internationale NCBI), et de localiser les gènes *tRNA* utilisés lors de l'intégration site-spécifique par les prophages. Les séquences nucléotidiques et protéiques de

gènes sont comparées à l'aide d'outils de BLAST et en utilisant le logiciel SnapGene (GSL Biotech). Les logiciels MEGA11 (Analyse génétique évolutive moléculaire version 11) ([Tamura et al., 2021](#)) et iTOL ([Letunic et Bork, 2021](#)) permettent la construction d'arbres phylogénétiques. Enfin, les génomes de la souche hôte du phage X27 et du mutant résistant BIM5.1 a été réalisée à l'aide du logiciel BRESEQ ([Deatherage et Barrick, 2014](#)).

Résultats et Discussion

Chapitre I

**Recherches de bactéries du genre *Oenococcus*
dans des niches peu ou pas explorées : le
kombucha et le kéfir de figues.**

I Isolement de souches de Kombucha

I - 1 Identification et caractérisation des BL à partir de kombucha

Un échantillon de kombucha commercial (Mama Kombucha®) a été analysé au laboratoire par dénombrement spécifique des populations bactériennes de bactéries lactiques (BL) et de bactéries acétiques (BA) sur géloses MRS et GYC, respectivement. Les incubations ont été réalisées en aérobiose (pour les BA) et en anaérobiose (pour les BL). Dans ce dernier cas, l'incubation a été prolongée 6-8 jours car les oenocoques se développent généralement plus lentement que les autres genres et espèces de BL. Les populations en BL et en BA ont été mesurées à 1.8×10^6 UFC/mL et $3,3 \times 10^4$ UFC/mL, respectivement.

Une quarantaine de colonies ont été choisies au hasard sur les boîtes MRS retenues pour le dénombrement des BL, et purifiées par 3 repiquages successifs. Dans un objectif d'identification, les colonies isolées ont été observées au microscope après coloration de Gram, puis analysées par MALDI-TOF. La grande majorité des colonies abritaient des coques appartenant à l'espèce *O. oeni*, et quelques colonies correspondaient à des bacilles, affiliés à l'espèce *Lb. nagelli*. Nous avons retenu un ensemble de 30 colonies de l'espèce *O. oeni* et leur appartenance à l'espèce a été confirmée par PCR en ciblant une portion du gène *mle*, le gène codant l'enzyme malo-lactique (Divol *et al.*, 2003). L'approche globale utilisée est représentée

Fig. 27.

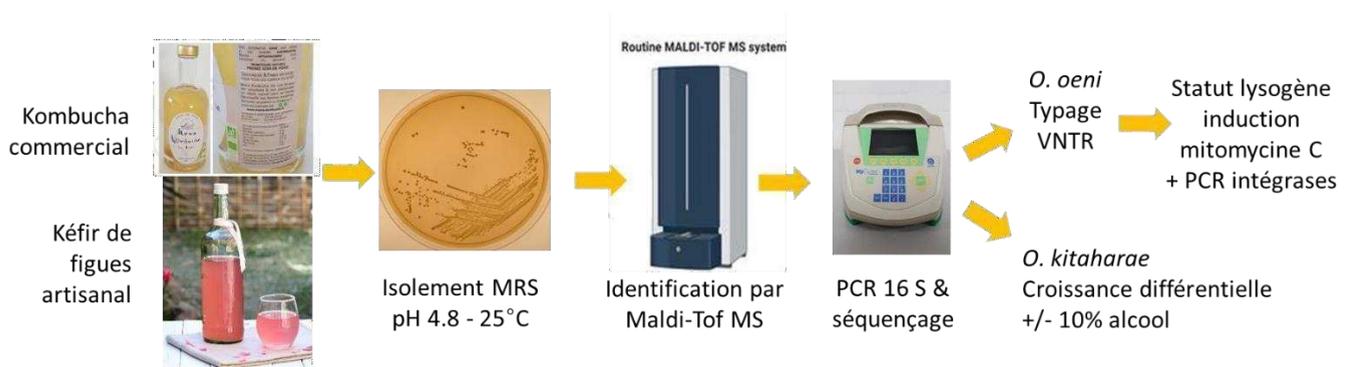


Figure 27 Schéma d'isolement et d'identification de souches de bactéries lactiques à partir de boissons.

En collaboration avec la doctorante Sayoko Matsumoto, l'étude a été approfondie par typage VNTR (MLVA). Le schéma, chez *O. oeni*, est basé sur l'analyse de 5 loci (Claisse et Lonvaud-Funel, 2014, 2012). Les profils ont été comparés avec ceux contenus dans notre base de données, qui abrite aujourd'hui plus de 10 000 profils originaux. Globalement, il a été observé que les

souches isolées de kombucha sont associées à 4 fonds génétiques, représentés par les souches BL4, BL7, BL15 et BL26. La souche BL26 présente un profil distinct des autres PR_F, et indique une proximité avec des souches issues de cidre, affiliées au phylogroupe B dans l'espèce *O. oeni*.

I - 2 Evaluation de la présence de prophages

I - 2 - 1 par induction à la mitomycine C

La présence de prophages chez les 30 souches nouvellement isolées a été évaluée par induction à la mitomycine C. La concentration de 1 µg/ml a été retenue car elle correspond à la dose optimale établie pour l'induction des prophages chez *O. oeni* en culture liquide (Jaomanjaka, 2014). Nous avons observé que la croissance des souches de kombucha est altérée en présence de l'inducteur, sans pouvoir observer toutefois de véritable lyse chez aucune souche, ce qui est habituellement le cas pour les souches lysogènes du vin dans les mêmes conditions de traitement (Fig. 28).

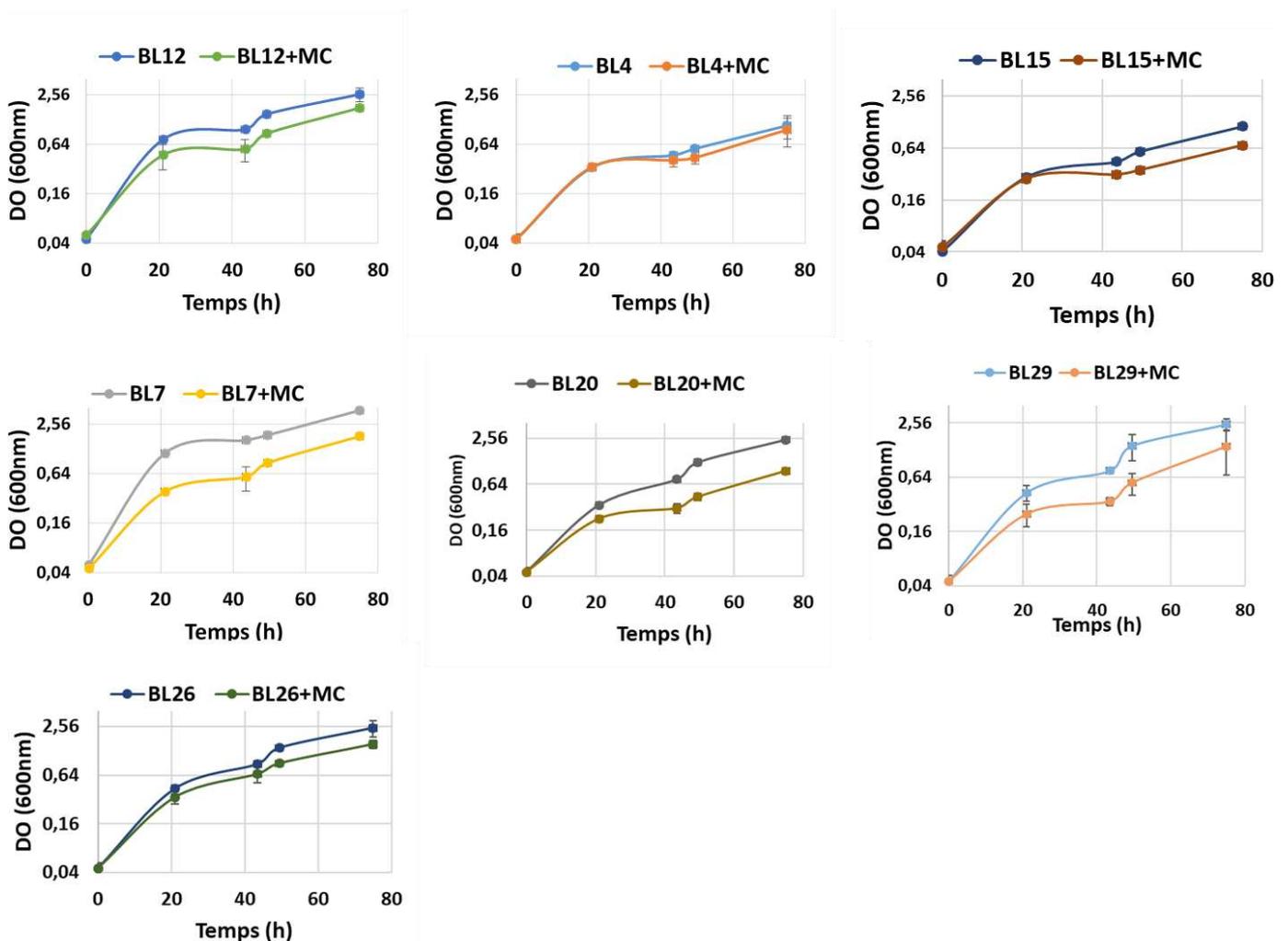


Figure 28 Croissance des souches de kombucha en milieu MRS avec ou sans mitomycine C (1 µg/ml).

I - 2 - 2 Par PCR

a. Stratégie déployée

Une approche complémentaire basée sur la recherche de séquences virales dans l'ADN chromosomique des souches de kombucha a été menée par PCR.

La lysogénie est fréquente chez *O. oeni* et 6 sites d'intégration de prophages, nommés $attB_{A-F}$, ont été identifiés dans le chromosome bactérien. Ils correspondent tous à des gènes codant des ARN de transfert. La reconnaissance spécifique de chaque site $attB$ par un prophage est corrélée à la présence d'une séquence particulière d'intégrase sur le génome viral (Claisse et al., 2021). Les intégrases sont également nommées Int_{A-F} .

Une seule exception à cette règle est connue. Elle est liée à l'occupation du site F. De manière générale, le locus $attB_F$ est le seul site à abriter les phages de type Int_F chez *O. oeni*. Cependant, il peut également accueillir des phages de type Int_B . Cet évènement est rare, et ne concerne que 20% des phages Int_B . Les 80% restants des phages Int_B sont intégrés au site $attB_B$.

Parmi les six sites qui peuvent accueillir des prophages (voir Fig. 22a, chapitre 1), trois peuvent également abriter des prophages vestigiaux en tandem avec un prophage complet (Claisse et al., 2021). Il s'agit des sites $attB_C$, $attB_D$ et $attB_F$ (Fig. 29). Les prophages vestigiaux sont des îlots phagiques de taille réduite (11-15 kb) par rapport aux prophages « complets » et inductibles, et sont aussi nommés remnants (Pr). Ils ont conservé quelques gènes d'origine phagique, dont celui codant l'intégrase, et portent également des fonctions supposées améliorer l'adaptation de la souche à son environnement, comme des mécanismes de résistance aux phages.

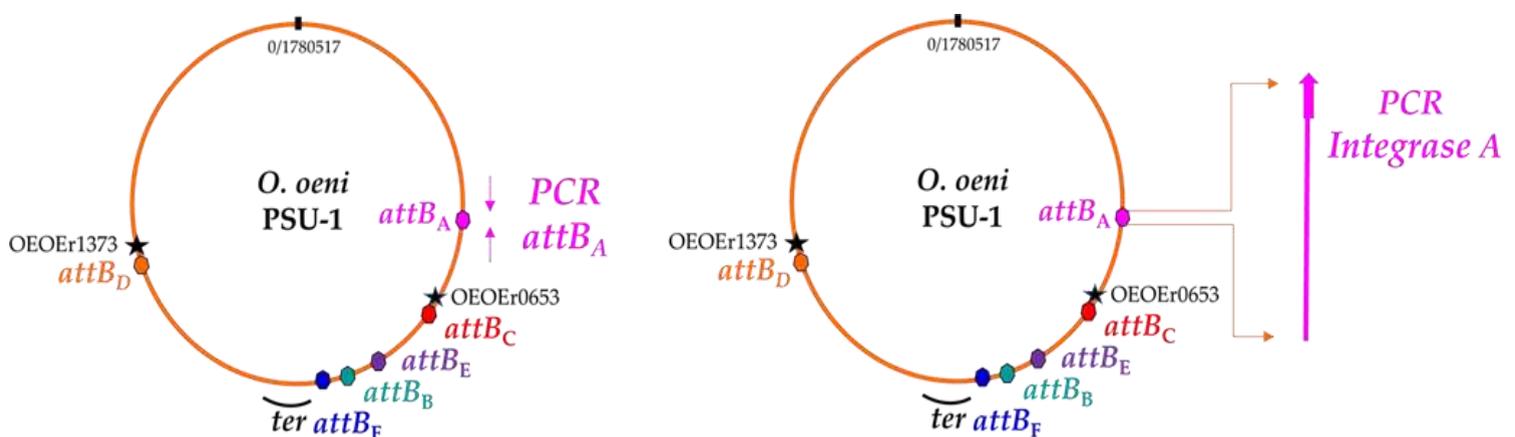


Figure 29 Stratégie de détection de la lysogénie chez *O. oeni* et localisation du/des prophages dans le chromosome bactérien : exemple du site $attB_A$. Un résultat positif en PCR $attB_A$ indique que la souche est non lysogène pour un prophage Int_A (gauche). Un résultat positif en PCR Int_A indique que la souche est susceptible de contenir un prophage de type Int_A (droite).

Tous ces éléments acquis précédemment au laboratoire ont permis de mettre en place un schéma de détection des prophages et PR chez *O. oeni* (Fig. 29). Il est basé sur la détection des sites $attB_{A-F}$ dépourvus d'éléments mobiles (les sites sont alors qualifiés de « vides »). L'obtention d'une amplification PCR en présence des amorces $attB$ pour une souche donnée révélera donc l'absence de prophage/PR au site analysé. *A contrario*, la non amplification d'un produit PCR suggèrera la présence d'éléments mobiles intégrés dans le site considéré. Dans ce cas, une PCR ciblant le gène de l'intégrase correspondante (int_{A-F}) sera effectuée, ainsi que des PCR spécifiques des PR si les sites considérés sont $attB_C$, $attB_D$ ou $attB_F$.

b. Résultats obtenus

Le statut lysogène des souches nouvellement isolées a été précisé en caractérisant l'occupation des 6 sites d'insertion dans leur génome. L'approche a été limitée aux souches qui présentaient des profils VNTR différents : BL4, BL7, BL12, BL15, BL20, BL26 et BL29d.

Les résultats pour BL4, BL7, BL12 et BL15 sont présentés Fig. 30. Nous observons l'absence d'éléments mobiles aux sites A, D et E dans les souches isolées de kombucha. *A contrario*, l'occupation des sites B, C et F est suggérée et elle est variable selon les souches.

L'occupation des sites B et C est atypique chez la souche BL26, qui contient un prophage Int_B au site $attB_B$ ainsi qu'un prophage vestigial PR_C dans le site $attB_C$. Les autres souches sont dépourvues d'éléments mobiles aux deux loci B et C.

L'occupation du site F est confirmée par la présence d'un amplicon Int_F de 294 pb, qui signe la présence d'un prophage de type F pour quatre des cinq souches. BL26 est la souche qui en est dépourvue. Comme évoqué précédemment, il est possible que chez les quatre souches positives, le prophage soit seul, ou bien en tandem avec un îlot F (type F1 ou F2). En effet, la PCR Int_F est spécifique du prophage et n'entraîne aucune réaction croisée avec les intégrases des îlots PR_F . Pour lever l'ambiguïté, nous avons complété l'analyse grâce à un couple d'amorces spécifiques des prophages vestigiaux F1/F2. Ceci a permis de montrer que les souches BL4, BL7, BL12 et BL15, BL20 et BL29 contiennent un prophage Int_F et un îlot PR_F en tandem au site F. BL26 contient uniquement un îlot PR_F au locus considéré (Fig. 30).

I - 3 Conclusions

En début de thèse, la collection CRBO de l'ISVV contenait essentiellement des souches de *O. oeni* issues du raisin et du vin, ainsi que quelques souches de cidre. Aucune souche de

kombucha n'était disponible. Toutefois, la présence de l'espèce *O. oeni* dans la boisson était connue. En effet, cinq souches (nommées UBOCC315001-05) avaient été isolées par les chercheurs du laboratoire LUBEM de l'Université de Bretagne Occidentale. Le décryptage de leur génome a permis de montrer qu'elles forment le 4^{ème} phylogroupe, nommé D, dans l'espèce *O. oeni* (Coton *et al.*, 2017).

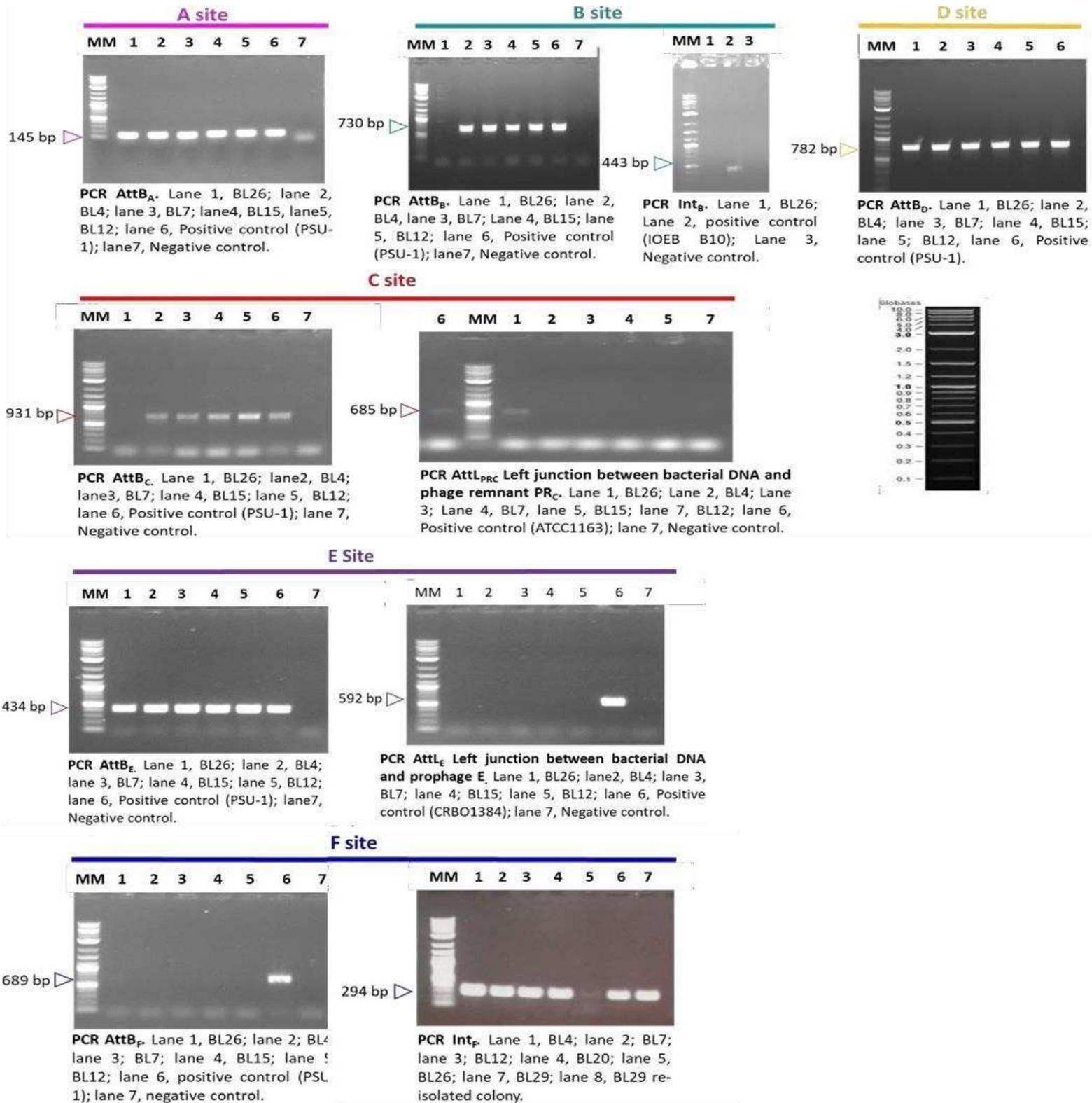


Figure 30 Occupation des sites attBA-F chez les souches isolées de kombucha

Plus récemment, la présence de souches de *O. oeni* a été également repérée dans des métagénomomes de kombucha et de vinaigre de kombucha collectés en Irlande (Leech *et al.*, 2020). Nos résultats confirment donc que le consortium bactérien associé au kombucha est constitué de souches d'*O. oeni* et l'étude réalisée permet d'enrichir la collection CRBO avec ces isolats.

Des approches *in silico* ont permis d'établir que quatre des cinq souches UBOCC séquencées abritent un prophage Int_F de 41 757 pb, intégré au site attB_F (Claisse *et al.*, 2021). Ce prophage est exclusif du groupe phylogénétique D et n'a jamais été associé aux souches *O. oeni* collectées de vins ou de cidres (phylogroupes A, B et C). La prévalence de prophages Int_F dans les souches issues de kombucha est confirmée.

L'absence de prophage Int_F et la présence d'un îlot PR_C sont deux critères habituellement associés aux souches des phylogroupes A et C chez *O. oeni* et sont autant d'indications que la souche BL26 n'appartient pas au phylogroupe D.

II Isolement d'oenocoques à partir de kéfir de figues

II - 1 Isolement et identification

Un kéfir maison confectionné à partir de figues a été collecté et isolé sur gélose au jus de raisin rouge. Deux types de colonies ont été observés : des colonies de plus grande taille, apparues en quelques jours sur la gélose et dont l'identification par Maldi-TOF a montré leur appartenance à l'espèce *Lb. paracasei*, ainsi que des colonies plus petites et plus tardives, qui se sont révélées affiliées à l'espèce *O. kitaharae*. Suite à cette première identification, les ADN de deux colonies (Y4.1 et Y4.8) ont été extraits et soumis à la PCR *mle* qui est spécifique de l'espèce *O. oeni*. Aucun amplicon n'a été obtenu, ce qui est conforme à l'identification en Maldi-TOF. Nous avons donc procédé à un complément d'identification au travers d'une amplification et du séquençage de l'ADN 16S. Les analyses ont confirmé l'appartenance des souches à l'espèce *O. kitaharae*. La souche Y4.1 a été rebaptisée CRBO2176 et versée à la collection de l'ISVV. De par son origine, cette souche est originale au sein de l'espèce *O. kitaharae*. Les seules souches décrites à l'heure actuelle, dont la souche-type DSM17330, ont été isolées de Shochu.

II - 2 Caractérisations préliminaires de la souche CRBO2176

II - 2 - 1 Recherche des caractères différentiels entre les espèces *O. oeni* et *O. kitaharae*

Selon [Endo et al. \(2006\)](#), quelques caractéristiques culturales permettent de distinguer les souches des espèces *O. oeni* et *O. kitaharae* (**Tab. VIII**). Les souches de *O. kitaharae* sont incapables de se développer en présence d'éthanol 10% et ne dégradent pas l'acide malique, alors que ces caractéristiques sont des marqueurs de *O. oeni* et expliquent sa présence et ses rôles lors de la fabrication du vin. Enfin, il a été également noté que la croissance de *O. kitaharae* est favorisée à pH 6,0-6,8, alors qu'elle est optimale à pH plus acide (4,8) pour *O. oeni* ([Endo et al., 2006](#)).

Tableau VIII Critères de différenciation des souches appartenant aux espèces *O. kitaharae* (NRIC 0645T) et *O. oeni* ([Endo et al., 2006](#)).

Characteristic	Strain NRIC 0645 ^T	<i>O. oeni</i>
Growth in broth containing 10% ethanol	—	+
Malolactic fermentation	—	+
Optimum pH for growth	6.0–6.8	4.8
Optimum temperature for growth	30	22
Acid from maltose	+	—

Nous avons soumis les deux souches isolées aux trois tests de différenciation en milieu MRS afin d'évaluer si les comportements étaient les mêmes pour les souches issues de Shochu et de kéfir. Les résultats sont présentés dans les **Fig. 31, 32 et 33**.

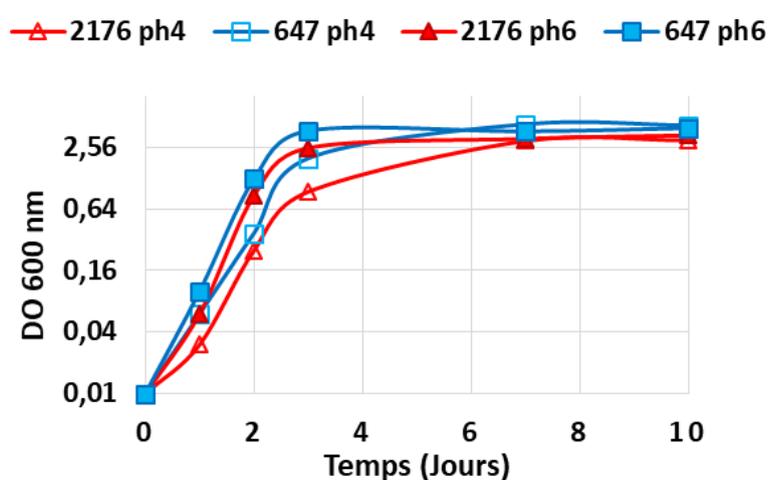


Figure 31 Comparaison de la croissance de *O. kitaharae* CRBO2176/Y4.1 (rouge) et NRIC0657 (bleu) en bouillon MRS à pH 4 (marqueurs blancs) et à pH 6 (marqueurs pleins) en bouillon MRS.

Conformément aux travaux de [Endo et al. \(2006\)](#), la croissance des souches de kéfir et de Shochu semble légèrement améliorée à pH6 par rapport au pH 4,8 ([Fig. 31](#)).

Le caractère inhibiteur de l'éthanol (10%) sur la croissance de *O. kitaharae* est également confirmé pour les souches de Shochu et de kéfir ([Fig. 32](#)), dès 48 heures d'incubation en bouillon MRS.

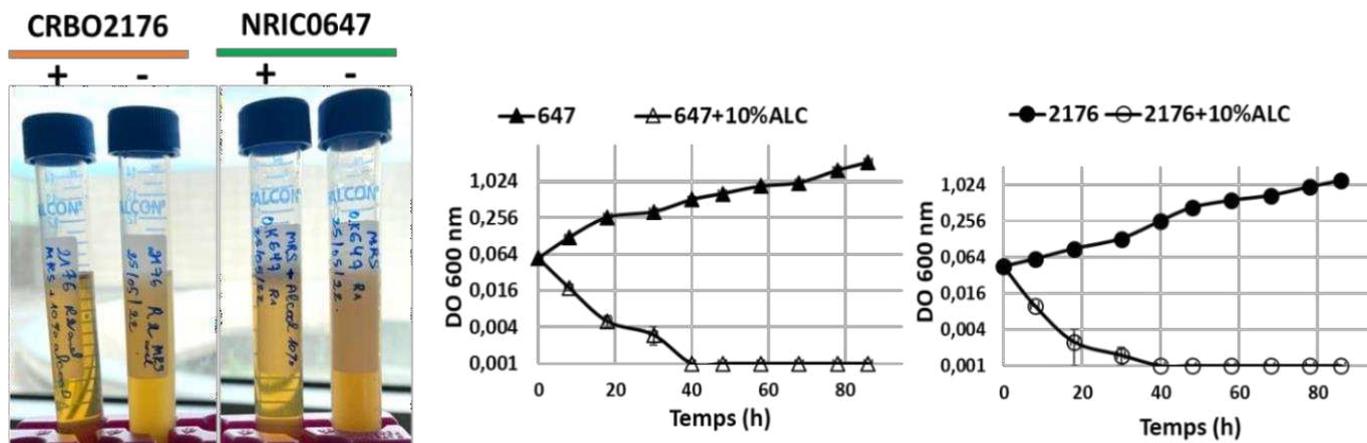


Figure 32 Comparaison de la croissance des souches *O. kitaharae* CRBO2176 et NRIC0647 en bouillon MRS en présence (+, ●, ▲) et en absence (-, △, ○) et d'éthanol 10% à 25°C.

Enfin, la croissance des deux souches de *O. kitaharae* en présence de malate a été testée en bouillon MRS ([Fig. 33](#)). Le composé a été ajouté à la concentration initiale de 6 g/L et sa dégradation mesurée en fonction du temps. Nous avons observé une absence de dégradation du malate pour la souche de Shochu (NRIC0647) en accord avec les données publiées ([Endo et al., 2006](#)). Par contre, la souche de kéfir de figes est capable de dégrader rapidement le malate. La perte d'activité ne semble donc pas être une signature de l'espèce *O. kitaharae*. La souche issue de kéfir se rapproche plus de l'espèce *O. oeni* sur ce critère.

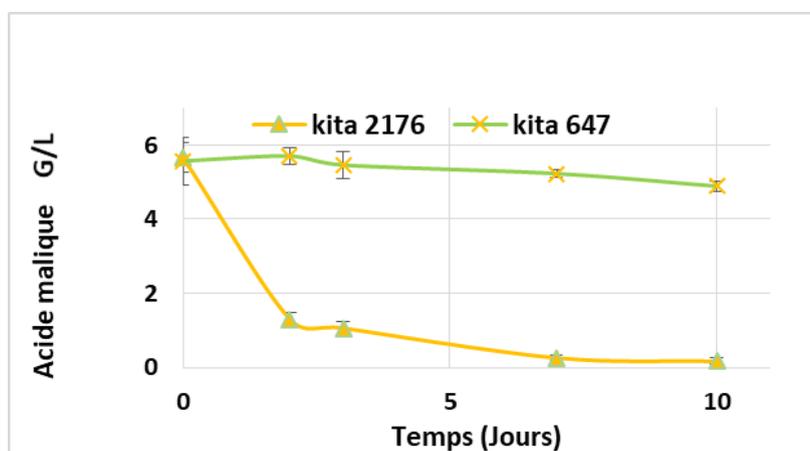


Figure 33 Cinétique de dégradation de l'acide malique par *O. kitaharae* CRBO2176 et NRIC0647.

II - 2 - 2 Présence de prophages

La souche CRBO2176/Y4.1 a montré une légère sensibilité en présence de MC 1 µg/mL, suggérant l'induction de prophages (Fig. 34). Comme évoqué précédemment pour les souches de kombucha, aucune lyse franche n'a été cependant observée.

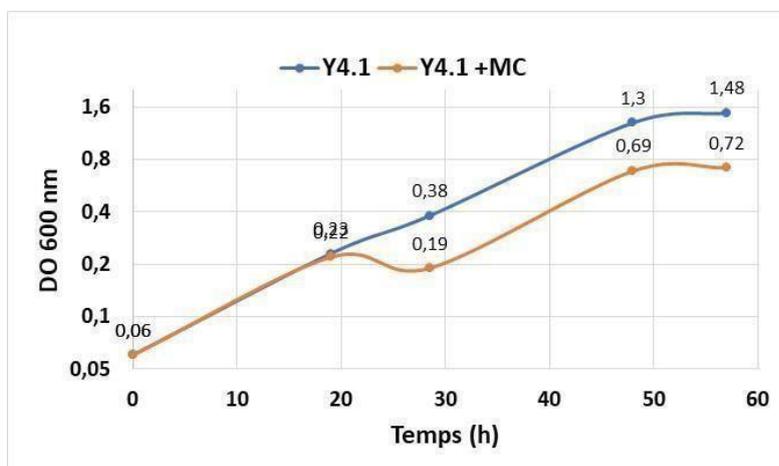


Figure 34 Courbe d'induction de la souche *O. kitaharae* CRBO2176 en présence de mitomycine 0,5 µg/mL, ajouté à DO 0,2.

La recherche par PCR des séquences signatures des 6 sites *attB*_{A-F} et des intégrases phagiques (A à F) identifiées chez *O. oeni* a donné des résultats négatifs pour la souche CRBO2176, comme pour la souche type DSM17330. Les résultats suggèrent que les prophages porteurs d'intégrases *Int*_{A-F} identifiés chez *O. oeni* sont absents chez *O. kitaharae* CRBO2176. Toutefois, l'analyse comparative *in-silico* des génomes de *O. kitaharae* DSM17330 et de *O. oeni* montre une forte variabilité entre les séquences des sites d'intégration *attB* entre les espèces. Par ailleurs, des différences existent au niveau de la présence/absence d'éléments génétiques d'origine non phagique et ceci avait été souligné par Borneman *et al.* (2012).

II - 3 Conclusions

Les premières souches de l'espèce *O. kitaharae* ont été isolées à partir d'une eau-de-vie japonaise distillée à base d'un grand nombre d'ingrédients, dont les principaux sont le riz, l'orge, et la patate douce (Endo *et al.*, 2006). Les membres de l'espèce sont donc *a priori* présents à faible concentration à la surface de différents végétaux, et sont probablement sélectionnés au cours de procédés ultérieurs de fermentation. La présence de *O. kitaharae* dans les kéfirs traduit leur présence sur les fruits secs utilisés. Elle a été également observée dans des consortia de kéfirs par les équipes de Pierre Renault à MICALIS, Florence Valence-

Bertel à Rennes (Unité STLO, INRAE), Monique Zagorec à Nantes (Unité SECALIM, INRAE) et Paul Cotter en Irlande ([Leech et al., 2020](#)).

III Analyses préliminaires des données génomiques des souches isolées de kombucha et de kéfir

Nous avons procédé au séquençage des souches de kombucha (*O. oeni*) et de l'isolat de kéfir (CRBO2176) par approche Illumina. Les drafts obtenus contiennent un nombre réduit de contigs par rapports aux assemblages réalisés de souches de *O. oeni* de vins. Cette première observation peut traduire une complexité moindre en termes de séquences répétées et d'éléments mobiles, dans les génomes.

Toutes les souches isolées possèdent dans leurs génomes deux opérons codant pour les ARN ribosomiques ainsi que les modifications de type indels associées à 13 protéines, qui signent l'appartenance au genre *Oenococcus* ([Bello et al., 2022](#)).

III - 1 Caractéristiques associées aux souches de l'espèce *O. kitaharae*

III - 1 - 1 Analyses du génome de la souche CRBO2176

La caractérisation des données de séquençage de la souche CRBO2176 a fait l'objet d'un article soumis à « Genome Announcement » le 25 octobre.



Draft Genome Sequence of *Oenococcus kitaharae* CRBO2176, Isolated from Homemade Water Kefir

Yasma Barchi,^a Amel Chaib,^a Florencia Oviedo-Hernandez,^a Marion Decossas,^b Olivier Claisse,^a  Claire Le Marrec^a

^aUniversity of Bordeaux, UMR 1366 INRAE, ISVV, Villenave d'Ornon, France

^bUniversity of Bordeaux, CBMN UMR 5248, Bordeaux INP, Pessac, France

ABSTRACT Here, we announce the draft genome sequence of an *Oenococcus kitaharae* strain isolated from homemade water kefir in Bordeaux, France. *O. kitaharae* CRBO2176 is deposited at the Biological Resources Center Oenology (CRBO) of the Institute of Vine and Wine Science (ISVV; Villenave d'Ornon, France).

Lactic acid bacteria are important in various fermentation processes, for which some species are described as highly versatile, while others are adapted to specific niches (1). This is especially true in fermented beverages, which harbor distinct members of the genus *Oenococcus* (2). Wine and apple ciders are undoubtedly the favorite habitats of *Oenococcus oeni* species, and strains have progressively been domesticated to this complex environment (2, 3). A few strains of *O. oeni* (4), as well as members of the three sister species, namely, *Oenococcus sicerae* (5), *O. alcoholitolerans* (6), and *O. kitaharae* (7), have also been isolated from overripe fruits and beverages with low alcohol content, such as water kefir (8). Here, we report the draft genome sequence of an *O. kitaharae* isolate from water kefir to enrich the limited genomic resources of *Oenococcus* species and better understand the processes of adaptation to kefir.

A homemade kefir prepared from figs (Bordeaux, France) was plated onto red grape juice agar (9), and the plates were incubated at 25°C for 5 days under anaerobic conditions. Slow-growing isolates were purified three times by single-colony isolation. Among these, an isolate (CRBO2176) was selected, and colony PCR was performed using the universal 16S primers fD1 and rD1 (10). Sequence analysis of the amplicon showed 99.9% similarity to *O. kitaharae* DSM 17330 (GenBank accession number [CM001398](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001398)) based on the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier algorithm (RDP trainset 18/release 11.5) (11). For whole-genome sequencing, the strain was statically cultivated for 72 h at 25°C in MRS broth (pH 6). Genomic DNA was extracted using the Promega DNA Wizard kit (2) and submitted to the Genome-Transcriptome Facility of Bordeaux for library preparation (QIAseq FX DNA; Qiagen, Courtaboeuf, France) and whole-genome sequencing (Illumina MiSeq v3), producing 2 × 254-bp paired-end reads.

Default parameters were used for all software unless otherwise specified. A total of 445,075 raw read pairs were obtained, trimmed using Trimmomatic v0.39 (12), and

TABLE 1 Characteristics of the kefir isolate and genome assembly in this study

Parameter	Finding
No. of contigs	7
Largest contig (bp)	647,507
Total length (bp)	1,754,187
N_{50} (bp)	578,835
N_{75} (bp)	411,412
L_{50}	2
L_{75}	3
GC content (%)	42.77

Editor David Rasko, University of Maryland School of Medicine

Copyright © 2023 Barchi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Claire Le Marrec, clehenaff@enscbp.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 20 October 2022

Accepted 23 February 2023

Published 29 March 2023

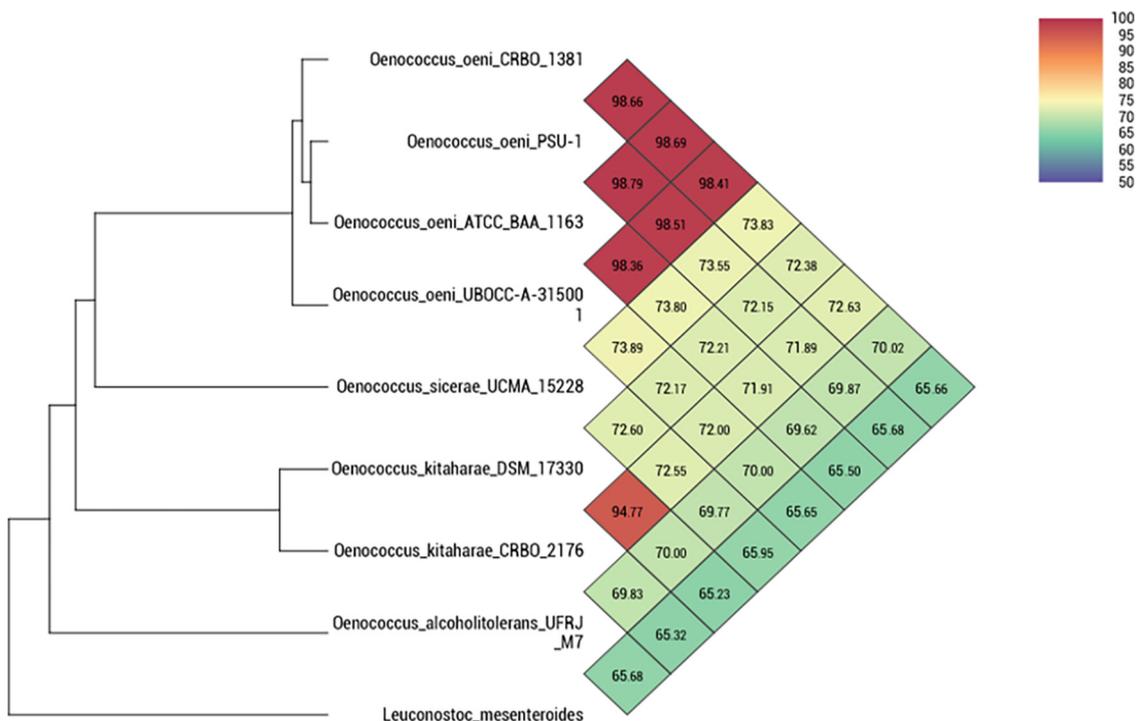


FIG 1 Heatmap showing the average nucleotide identity by orthology (OrthoANI) between strain CRBO2176 and all the type strains of the genus *Oenococcus*, calculated using OAT software, with *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 (GenBank accession number [GCA_000014445.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/ accession/GCA_000014445.1)) used as the outgroup.

assembled using SKESA v2.4.0 (13), generating 7 contigs with a genome length of 1,754,187 bp and 66-fold coverage (Table 1). Plasmids and prophages were absent from CRBO2176 according to PlasmidFinder v2.1.1 (14) and PHASTER (Web service; accessed August 2022) (15). The NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v6.2 (16) was used to predict 1,771 genes, with 1,721 coding DNA sequences, 44 tRNA genes, and 3 rRNA genes.

Like other members of the genus *Oenococcus*, strain CRBO2176 can reliably be distinguished from all other *Leuconostocaceae* and *Lactobacillaceae* species by the presence of conserved signature indels (CSIs) in 13 proteins: DNA-directed RNA polymerase subunit beta, two different CSIs in translocase subunit SecY, 50S ribosomal protein L13, molecular chaperone DnaK, riboflavin kinase, Sua5/YciO/YrdC/YwIC family protein, RluA family pseudouridine synthase, amino acid permease, TatD family hydrolase, YidC/Oxal family membrane protein insertase, class I S-adenosylmethionine (SAM)-dependent RNA methyltransferase, and GTPase HflX (17).

The draft genome showed a Mash (18) (MinHash v1.1) distance of 0.0333 and an average nucleotide identity of 94.77% (calculated using OrthoANI v1.40 [19]) with the type strain DSM 17330 (GenBank accession number [NZ_CM001398](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/ accession/NZ_CM001398)), isolated from shochu (Fig. 1).

Data availability. The 16S rRNA gene sequence, genome sequence, and raw sequencing reads for CRBO2176 have been deposited at GenBank under accession numbers [OP985037](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/ accession/OP985037) and [JANJQP000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/ accession/JANJQP000000000), BioProject accession number [PRJNA865506](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BioProject/ accession/PRJNA865506), BioSample accession number [SAMN30114423](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BioSample/ accession/SAMN30114423), and SRA accession number [SRR21928607](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SRA/ accession/SRR21928607).

ACKNOWLEDGMENT

Support for this project was provided by the French ANR (grant ANR-20CE20-0008-01).

REFERENCES

- Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, Mayo B, Westerik N, Hutkins R. 2020. Fermented foods in a global age: east meets west. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19:184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>.
- Campbell-Sills H, El Khoury M, Favier M, Romano A, Biasioli F, Spano G, Sherman DJ, Bouchez O, Coton E, Coton M, Okada S, Tanaka N, Dols-Lafargue M, Lucas PM. 2015. Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni*

- reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome Biol Evol* 7:1506–1518. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv084>.
3. Lorentzen MPG, Lucas PM. 2019. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:2937–2945. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09689-z>.
 4. Zanirati DF, Abatemarco M, de Cicco Sandes SH, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E. 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32:70–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>.
 5. Verce M, De Vuyst L, Weckx S. 2020. The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefirii* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol* 88:103402. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103402>.
 6. Badotti F, Moreira APB, Tonon LAC, de Lucena BTL, de Cássia O Gomes F, Kruger R, Thompson CC, de Morais MA, Jr, Rosa CA, Thompson FL. 2014. *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:1259–1267. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0296-z>.
 7. Endo A, Okada S. 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting *Oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2345–2348. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64288-0>.
 8. Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK. 2021. An update on water kefir: microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol* 345:109128. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2021.109128>.
 9. Chaïb A, Philippe C, Jaomanjaka F, Claisse O, Jourdes M, Lucas P, Cluzet S, Le Marrec C. 2019. Lysogeny in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* is responsible for modified colony morphology on red grape juice agar. *Appl Environ Microbiol* 85:e00997-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00997-19>.
 10. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
 11. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 42:D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>.
 12. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
 13. Souvorov A, Agarwala R, Lipman DJ. 2018. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biol* 19:153. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>.
 14. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
 15. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
 16. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
 17. Bello S, Rudra B, Gupta RS. 2022. Phylogenomic and comparative genomic analyses of *Leuconostocaceae* species: identification of molecular signatures specific for the genera *Leuconostoc*, *Fructobacillus* and *Oenococcus* and proposal for a novel genus *Periweissella* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 72:005284. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005284>.
 18. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol* 17:132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>.
 19. Lee I, Kim YO, Park S-C, Chun J. 2016. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>.

III - 1 - 2 Comparaisons entre les souches CRBO2176 et DSM17330

Les deux souches ont un ensemble de 1536 gènes communs et le nombre d'ORF spécifiques est plus important pour la souche de Shochu (n=26) que pour celle issue de kéfir (n=6) (Fig. 35).

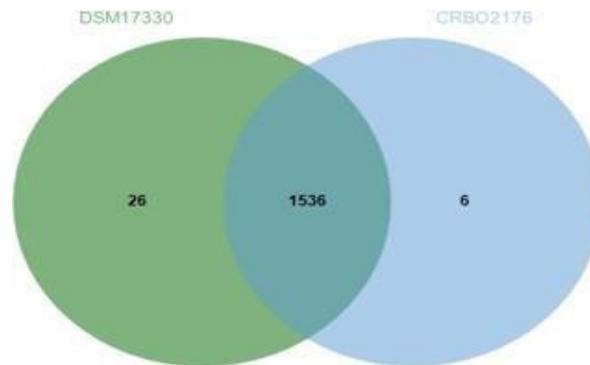


Figure 35 Comparaison des ORFs spécifiques des génomes des souches DSM17330T et CRBO2176.

III - 1 - 2 - a La souche CRBO2176 ne contient pas de mutation dans le gène *mle*

Chez la souche-type DSM17330, l'absence de l'activité enzymatique Mle est liée à la présence d'un codon stop précoce dans le gène *mle* (Borneman *et al.*, 2012). Ces données sont représentées Fig. 36.

L'analyse du gène *mle* chez la souche CRBO2176 montre l'absence de codon stop, et la protéine a une taille similaire avec celle de *O. oeni* PSU-1 : les deux séquences partagent 84% d'identité. La présence d'un gène *mle* fonctionnel chez CRBO2176 confirme les cinétiques de dégradation réalisées et présentées Fig. 33. et *O. oeni* PSU-1 (d'après Borneman *et al.*, 2012). Le codon stop est matérialisé par une étoile.

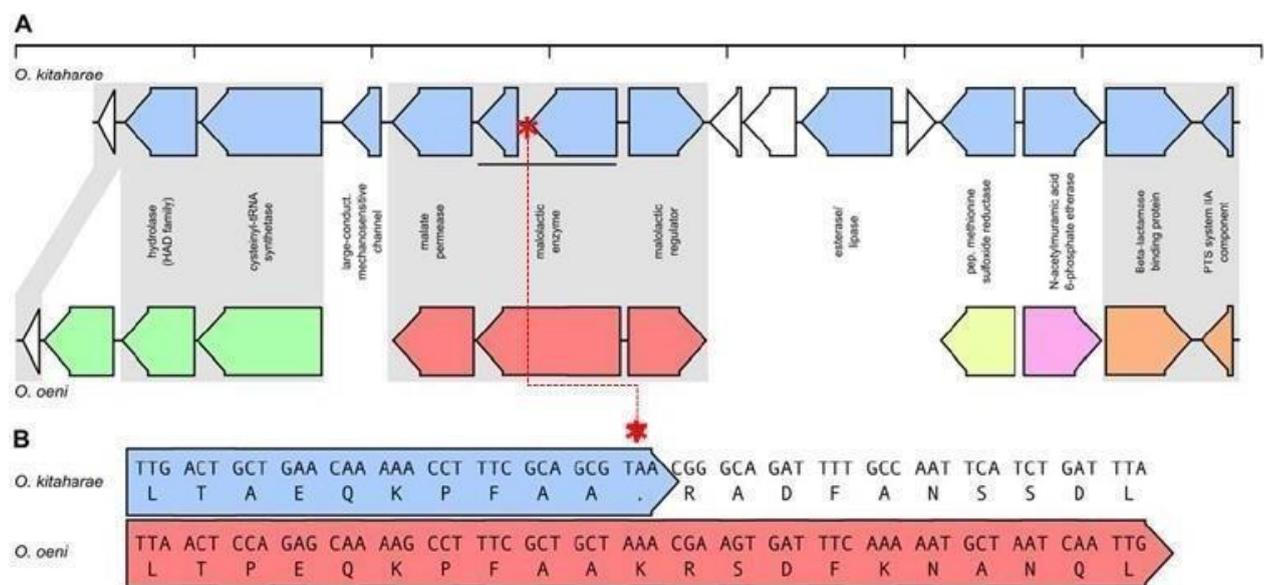


Figure 36 Comparaison des cadres de lecture du gène *mle* chez *O. kitaharae* DSM17330.

III - 1 - 2 - b Autres différences entre les souches de Shochu et de kéfir d'eau

Une première comparaison des génomes a été réalisée dans le système RAST. Les différences majeures après inférences métaboliques sont rassemblées dans le **Tableau IX**.

Tableau IX Fonctions différentielles entre les génomes des souches CRBO2176 et DSM17330

Voies KEGG		CRBO2176	DSM17330
Acides Aminés et dérivés	Synthèse d'alanine	-	Cystéine désulfurase
	Synthèse d'arginine	-	Acetylglutamate kinase; Acetylornithine aminotransférase ; Acetylornithine deacetylase
	Métabolisme des polyamines	-	Transporteur de putrescine (PotABCD)
	Synthèse d'histidine	-	8 gènes dont ATP phosphoribosyltransferase ; Histidinol dehydrogenase ; Histidinol-phosphate aminotransferase
	Synthèse de lysine	-	Dihydrodipicolinate reductase et synthase
Carbohydrates	Utilisation du D-glycerate	-	Transporteur de D-glycerate
	Utilisation du ribose	-	5 gènes permettant l'utilisation du ribose
	Déoxyribose et catabolisme des déoxynucleosides	-	3 gènes
	Mannose et fructose	-	Gènes PTS
	Transport du glycérol	UgpCAE	-
Paroi cellulaire & capsule	Glycanes riches en Rhamnose	-	Alpha-D-GlcNAc alpha-1,2-L-rhamnosyltransferase ; capsular polysaccharide biosynthesis protein
	Recyclage "Peptidoglycan Amino Sugars"	-	N-acétylmuramic acid 6-phosphate etherase
	Synthèse d'UDP-N-acétylmuramate à partir de fructose-6-phosphate	-	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase ; UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase
	tRNA-dependent amino acid transfers	-	tRNA-dependent lipid II--L-alanine ligase ; tRNA-dependent lipid II-Ala--L-alanine ligase
Transport Membranaire	Transporteur ABC oligopeptides	-	OppADFBC
Métabolisme du potassium	Transport de K ⁺	-	Osmosensitive K ⁺ channel histidine kinase KdpD ; Potassium voltage-gated channel subfamily KQT
Cell signaling	Système HPr de répression catabolique	-	HPr kinase/phosphorylase
	Phéromones de <i>Enterococcus faecalis</i> et autres Firmicutes	-	Heptaprenyl diphosphate synthase component I ; Putative pheromone precursor lipoprotein
Respiration	ATP synthase		FOF1-type ATP synthase
Réponse au stress	Protéines Cold shock		Famille de protéines CspA
	Contrainte Osmotique		Transporteurs de Choline et de Betaine (OpuACB)

a. Equipements dédiés au transport des oligopeptides.

Ces transporteurs font partie du système protéolytique. Chez la BL *Lc. lactis*, il comprend également une protéinase d'enveloppe, les transporteurs de tri-et dipeptides DtpT et Dpp, ainsi que des peptidases intra-cellulaires.

La fonction de transport d'oligopeptides est assurée par un type de transporteur de la famille ABC, nommé Opp pour « Oligopeptide permease » qui comporte cinq sous-unités nommées OppA, OppB, OppC, OppD et OppF. Son organisation structurale et fonctionnelle chez les bactéries à Gram-positif est représenté **Fig. 37**. Opp est présent chez les bactéries à Gram-négatif comme chez les bactéries à Gram positif. Il a été caractérisé en premier chez *Salmonella typhimurium* pour son rôle dans l'internalisation des oligopeptides présents dans un milieu

riche en peptides. Son activité est primordiale pour la croissance des bactéries car les sources principales d'acides aminés, de carbone et d'azote sont sous forme d'oligopeptides. Aussi, le rôle du transporteur Opp est essentiel pour la nutrition des bactéries dans un milieu riche en peptides. La taille moyenne des peptides transportés varie selon l'espèce bactérienne.

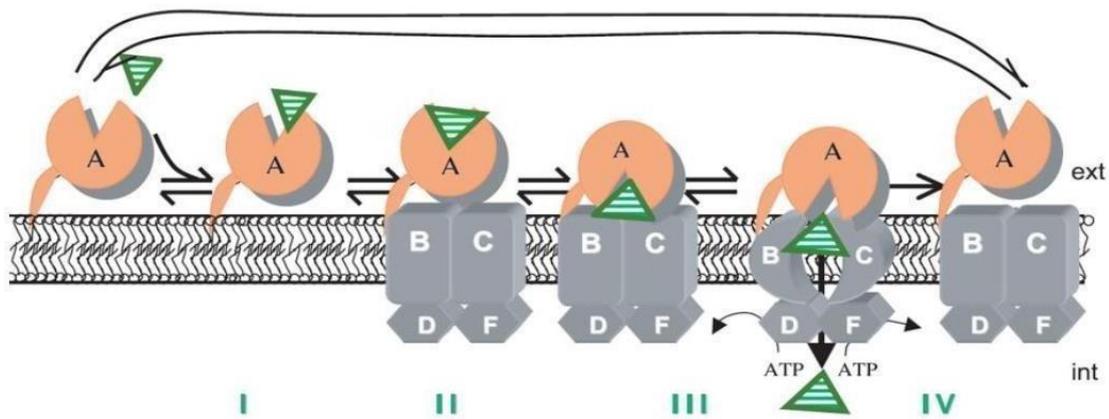


Figure 37 Organisation structurale et fonctionnelle du transporteur Opp chez les bactéries à Gram-positif. La protéine OppA ancrée à la membrane de la famille SBP se lie à son substrat, les oligopeptides, (triangles verts). Cette fixation induit une conformation fermée de la SBP OppA (Etape I). Le substrat est transmis à la perméase formée par les sous-unités OppB et OppC par la SBP OppA (Etape II) provoquant un changement de conformation de la perméase (Etape III). La translocation du substrat à travers la membrane est permise par l'hydrolyse de deux molécules d'ATP par le sous-unités intracellulaires OppD et OppF (Etape IV). Extrait de [Lingeswaran, 2020](#).

Opp a un rôle supplémentaire dans la physiologie de la bactérie et est impliqué dans les mécanismes de Quorum Sensing (QS) chez les bactéries à Gram-positif. Opp importe les phéromones matures du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire pour la détection en intracellulaire ([Lingeswaran, 2020](#)).

Au sein de l'espèce *O. kitaharae*, la souche de Shochu dispose de deux transporteurs distincts, ce qui n'est pas le cas chez *O. oeni* CRBO2176 issue de kéfir (**Fig. 38**). L'existence de multiples copies de systèmes de transport d'oligopeptides dans certains génomes est observée de manière répandue chez les BL mais la raison de cette redondance n'est pas toujours connue. C'est le cas par exemple chez la BL *S. thermophilus* qui comporte deux systèmes majeurs Opp et AMI, capables d'internaliser des peptides dont la taille peut atteindre 23 acides aminés ([Rodríguez-Serrano et al., 2018](#)) et chez *Enterococcus faecalis* ([Segawa et al., 2021](#)).

Enfin, on note chez les deux souches une duplication du gène OppA au niveau du transporteur commun Opp. Ceci est observé chez d'autres BL et répondrait à la nécessité pour la souche d'augmenter l'activité de transport des peptides.

Les expériences sont à poursuivre afin de comprendre si les deux opérons sont fonctionnels chez DSM17330, de préciser s'ils présentent la même affinité ou pas pour les peptides (taille, hydrophobicité, présence d'acides aminés branchés ...) et enfin de comprendre leur rôle notamment dans l'établissement d'interactions avec d'autres souches. Chez les BL, la proto-coopération est décrite et correspond à une relation bénéfique au développement des deux espèces *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le lait. Elle implique notamment la dégradation de protéines par l'une pour mettre les peptides à disposition du partenaire. L'implication du transport d'oligopeptides dans les interactions positives entre lactobacilles et entérocoques est également montrée. La fourniture de peptides riches en acides aminés hydrophobes et branchés par une BL est à la base de l'établissement d'interactions positives avec une autre BL non protéolytique, et permet sa croissance (Canon *et al.*, 2021).

Locus Opp

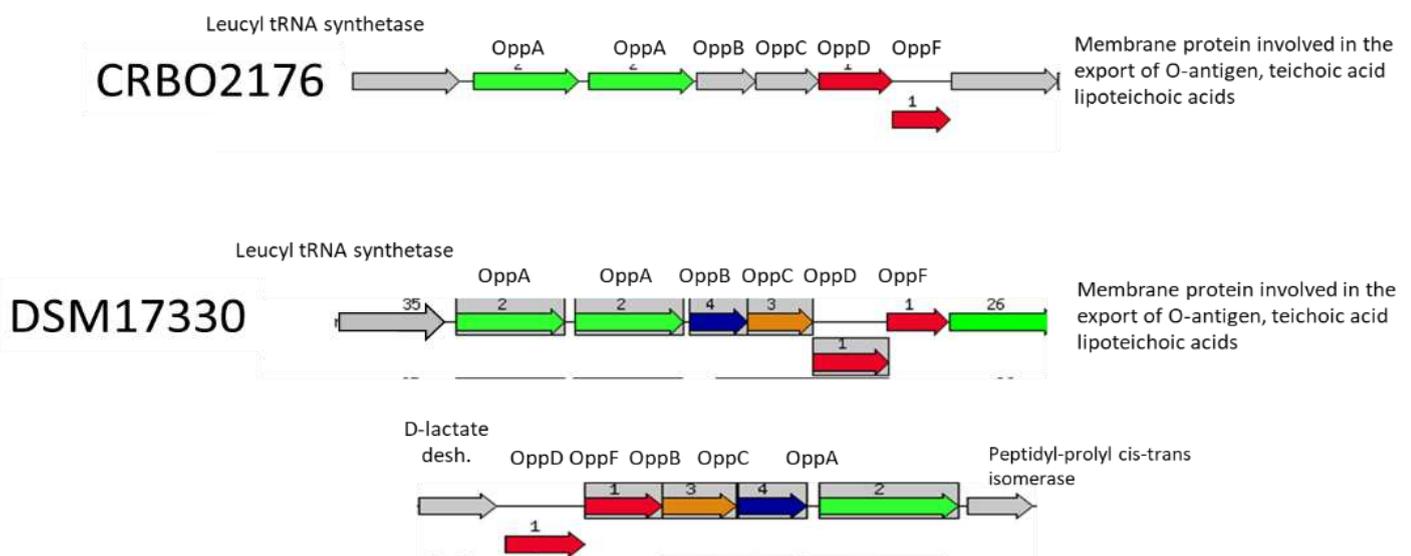


Figure 38 Structure des opérons dédiés au transport d'oligopeptides chez les deux souches de l'espèce *O. kitaharae*. Le second locus présent chez la souche DSM17330 est en aval du gène codant la malate perméase.

b. Enveloppe

D'autres différences sont visibles entre les souches de *O. kitaharae* au niveau de la constitution de l'enveloppe. Ainsi, le gène Alpha-D-GlcNAc alpha-1,2-L-rhamnosyltransférase est présent chez la souche DSM17330 et absent chez CRBO2176.

Chez *O. oeni*, le gène est nommé Wob_b et est positionné dans le locus eps1 (environ 50 kb) (Dimopoulou *et al.*, 2014). Il intervient dans la synthèse d'un hétéropolysaccharide constitué de glucose, galactose et de rhamnose, qui est présent majoritairement sous forme capsulaire (Fig. 39). Le locus est caractérisé par sa grande variabilité dans l'espèce *O. oeni* (Dimopoulou

et al., 2014) et ceci est également retrouvé chez *O. kitaharae*. A l'heure actuelle, le rôle joué par le polymère et le mécanisme de synthèse ne sont pas connus dans le genre. Contrairement à ce qui est montré chez *L. lactis*, le locus ne comprend pas d'analogues de *rgpC* et *rgpD*, qui codent le transporteur ABC responsable de l'export à travers la membrane de la chaîne nouvellement assemblée. Cela suggère qu'un autre mécanisme serait utilisé. L'export pourrait être assuré par la voie dite Wzx/Wzy-dépendant, comme chez certains lactobacilles. Dans ce cas, des unités répétées sont synthétisées sur une entité C₅₅-PP sur la face cytoplasmique de la membrane, transportées sur la face externe par la flippase Wzy, et transférées sur la chaîne en élongation CWPS depuis le transporteur lipidique (Guérin *et al.*, 2022).

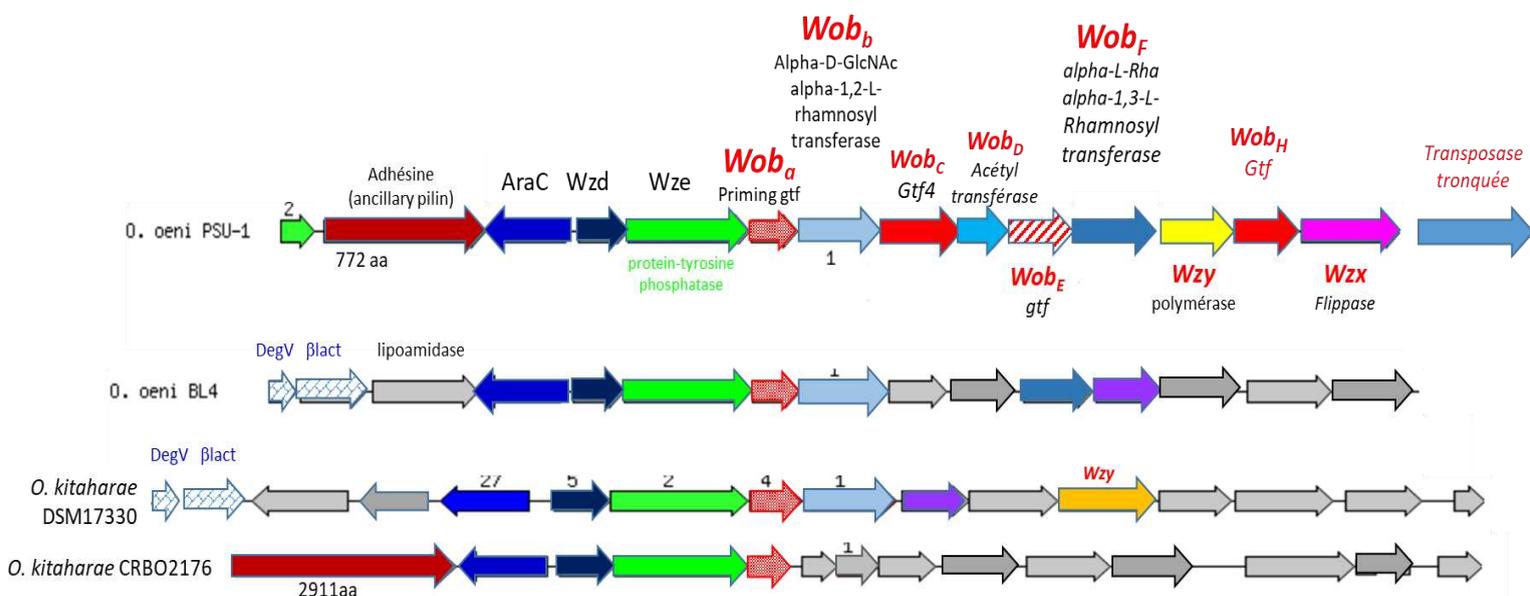


Figure 39 Structure du locus eps1 chez *O. oeni* PSU-1, BL4 et les deux souches de *O. kitaharae*. La terminologie des gènes est celle adoptée par Dimopoulou *et al.* (2014).

Des progrès importants ont été obtenus dans la compréhension de la structure des enveloppes chez les bactéries à Gram positive qui partagent la morphologie de type coque (*L. lactis*, *Ent. Faecalis* ainsi que les streptocoques pathogènes comme *S. agalactiae*) (Fig. 40). La présence de polysaccharides capsulaires, de polymères de paroi (ici rhamnane) et de LTA et l'ajout de modifications sur le rhamnane (PSP) et/ou les LTA apporte un degré de complexité.

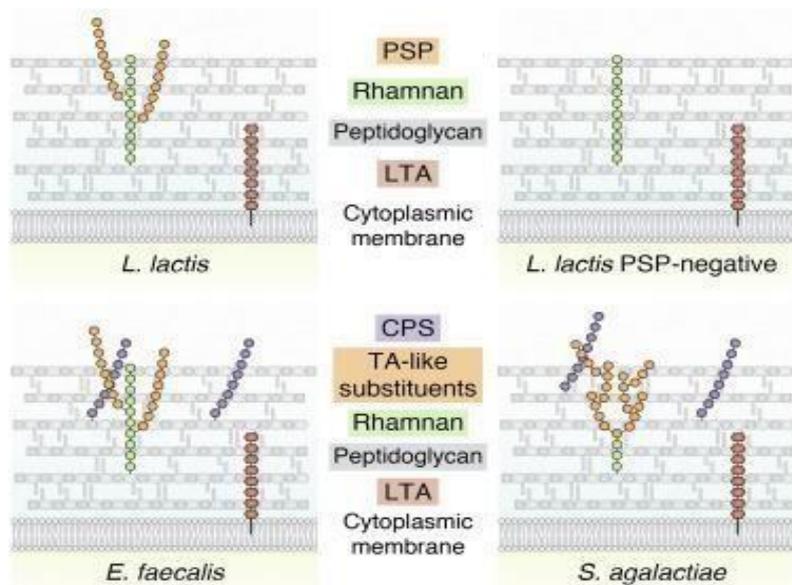


Figure 40 Schéma de la localisation des polysaccharides riches en rhamnose chez quelques bactéries à Gram positive présentant une forme de coque. Le peptidoglycane est représenté en gris, les polymères de rhamnane sous forme de chaînes de cercles verts, et les chaînes latérales (PSP ou acides téchoïques) sous forme de chaînes de cercles oranges. Les polysaccharides capsulaires sont en violet. LTA, acide lipotéchoïque (Guérin *et al.*, 2022).

c. Réponse à la contrainte osmotique

L'équipement qui permet aux bactéries de réponse à la contrainte osmotique semble également différent. Ainsi, la souche DSM17330 semble disposer de mécanismes dédiés à l'import de solutés compatibles : potassium (Kdp) et bétaïnes (OpuA) destinés à lutter contre un déséquilibre osmotique induit à par une élévation de la pression osmotique dans le milieu extérieur (Le Marrec, 2007).

d. Le locus CRISPR

La souche CRBO2176 est dépourvue de système CRISPR, contrairement à DSM17330. L'étude détaillée de ce locus sera présentée dans le chapitre II.

III - 1 - 3 Mise au point d'une PCR spécifique de l'espèce *O. kitaharae*

La PCR d'espèce *O. oeni* a été développée à l'aide d'amorces localisées dans le gène *mle* par Divol *et al.* (2003) à une époque où aucune autre espèce n'était connue. Nos travaux ont confirmé l'absence d'amplification chez les deux souches de *O. kitaharae*. Ces observations nous ont conduit à définir un nouveau couple d'amorces *mle*, spécifiques de l'espèce *O. kitaharae* ($mle_{F_{kita}}$ 5'-TGATCAAACTTCGCTTGGGTT-3' et $mle_{R_{kita}}$ 3'-RACAACAAAACAAGCTCT-5'). Son utilisation permet d'amplifier un produit de 676 pb à partir de l'ADN des souches de *O. kitaharae* (Fig. 41).

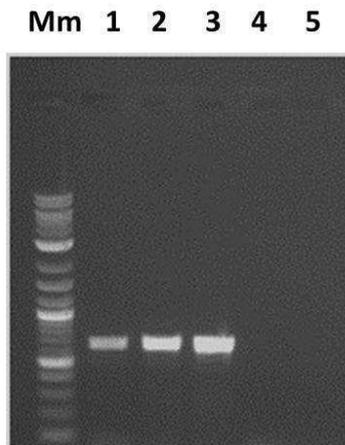


Figure 41 PCR spécifique proposée pour l'espèce *O. kitaharae*. Puits 1 ; *O. kitaharae* NRIC 0649 ; Puits 2, Y4.8 ; Puits 3, CRBO2176 ; Puits 4, *O. oeni* IOEBS277 ; Puits 5, témoin négatif; Mm, marqueur de poids moléculaire 1 kb ladder.

III - 2 Les souches de kombucha appartiennent au phygroupe D

La proximité phylogénétique des souches *O. oeni* BL4, BL12, BL20 et BL26 avec les représentants déjà connus dans les phylogroupes D (souches UBOCC), A, B, C est représentée **Fig. 42**. Tout d'abord les souches sont phylogénétiquement très proches entre elles. Elles correspondent à un troisième sous-groupe dans le cluster D. Les deux premiers sont représentés par les souches UBOCC-A- 31002 et UBOCC-A-31005. La souche BL26 est affiliée au groupe C.

Tree scale: 0.01

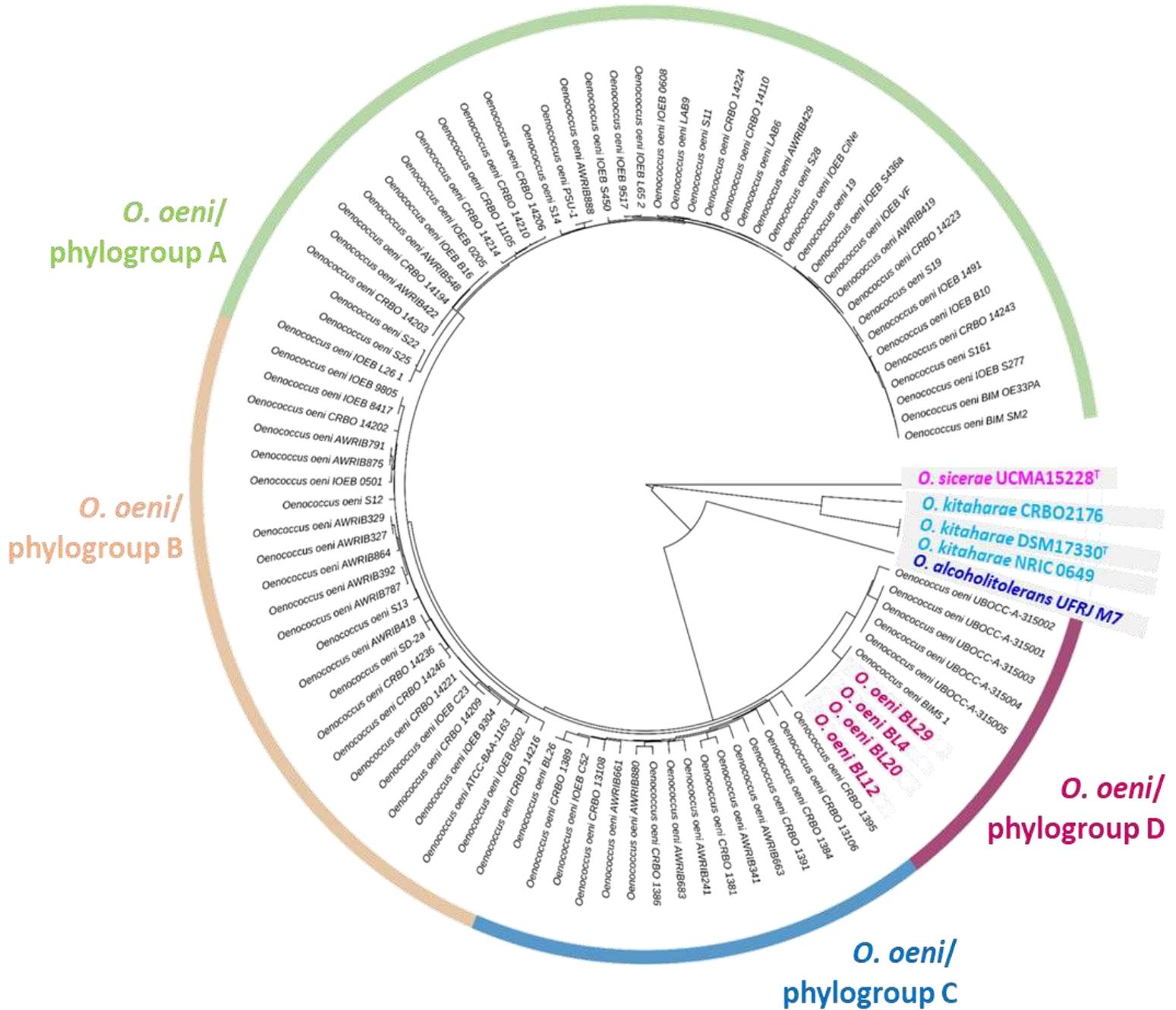


Figure 42 Arbre phylogénétique des souches isolées dans cette étude. Les souches *O. oeni* BL4, BL12 et BL20 et BL29 sont affiliées au phylogroupe D (violet) chez l'espèce *O. oeni*, et BL26 au groupe C (bleu). Les groupes A et B sont représentés en vert et beige, respectivement. Les souches de l'espèce *O. kitaharae* dont CRBO2176 sont en bleu cyan et les souche-type des espèces *O. siceræ* et *O. alcoholitolerans*.

III - 3 Eléments mobiles présents chez les oenocoques associées au kombucha et au kéfir

Les génomes des souches isolées ne contiennent pas ou peu de prophages complets. Seules les souches de kombucha contiennent un prophage de type Int_F (41,757 pb) qui est en tandem avec un îlot PR_F. Ceci est conforme (i) avec les résultats de PCR présentés **Fig. 30** et (ii) l'analyse faite dans le cadre de cette étude des souches isolées par l'Université de Bretagne Occidentale (**Tab. X**).

Nous avons également réalisé un inventaire préliminaire des prophages remnants chez les nouvelles souches isolées. Chez *O. oeni*, en marge des sites att_{B_{A-F}}, trois autres sites remarquables nommés sites G, H et I ont été décrits (Claisse *et al.*, 2021). Ils correspondent également à des tRNA. Ils ne contiennent pas de prophages *à priori* fonctionnels mais peuvent être occupés par des îlots génomiques (PR). Les intégrases affiliées (Int_G, Int_H, Int_I) sont éloignées phylogénétiquement de celles des prophages Int_{A-F}, et leur acquisition par transfert horizontal à partir d'autres BL comme les Lactobacilles a été proposée (Claisse *et al.*, 2021). Ces îlots sont susceptibles d'apporter des fonctions spécifiques utiles à l'adaptation aux environnements.

L'occupation des sites par des prophages vestigiaux chez les oenocoques isolés de kombucha et de kéfir a été effectuée *in silico*. Nous avons vérifié la présence de la séquence du site puis la présence de chaque intégrase. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les souches *O. oeni* de kombucha isolées à l'UBO, la souche *O. kitaharae* DSM17330 de Shochu et les souches *O. sicerae* issues de cidre et de kéfir (**Tableau X**). Nous observons que la région associée au site F est modifiée chez les souches des espèces *O. sicerae* et *O. kitaharae*, ce qui explique pourquoi les îlots ne sont pas retrouvés.

Tableau X Recherche des prophages vestigiaux PRC, PRD, PRG, PRH et PRI chez les souches isolées de kéfir et de kombucha.

Souches			PR _C	PR _F	PR _G	PR _H	PR _I
<i>O. oeni</i>	Kombucha	BL4	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-
		BL12	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-
		BL20	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-
		BL29d	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-
		UBOOC 315001	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
<i>O. sicerae</i>	cidre	UCMA15228	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
	Kefir d'eau	OAL24	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-
<i>O. kitaharae</i>	Shochu	DSM17330	+/+	-/-	+	+/-	+/+
	Kefir d'eau	CRBO2176	+/+	-/-	+/+	+	+/+

Conservation du site/présence d'un ilôt

IV Conclusions du chapitre

Les connaissances actuelles sur les bactéries du genre *Oenococcus* portent sur l'espèce *O. oeni*, dont les membres sont associés aux niches cidricole et œnologique. Notre objectif était de mieux comprendre la diversité des oenocoques associés à deux boissons fermentées, le kéfir d'eau et le kombucha. Ces produits ont gagné en popularité auprès des consommateurs ces dernières années, en particulier en Amérique du Nord et en Europe, car elles sont considérées comme des alternatives naturelles aux boissons gazeuses artificielles. Leur consommation augmente régulièrement et pourrait à l'avenir stimuler le marché des cultures microbiennes lyophilisées.

Nos travaux ont permis d'identifier la présence des espèces *O. kitaharae* et *O. oeni* dans le kéfir de figues et le kombucha, respectivement. Des travaux menés sur la même période par d'autres équipes vont dans le même sens et s'appuient sur des isollements de souches ou la détection d'ADNs bactérien au sein de métagénomes. L'ensemble des données permet d'étendre le spectre des aliments fermentés abritant des oenocoques aux olives et aux graines de moutarde fermentées (Fig. 43).

La boisson dans laquelle sont retrouvées les quatre espèces d'*Oenococcus* est le kéfir de fruits. Notre approche ne permet pas d'estimer la contribution relative des espèces dans les deux boissons analysées. Cependant selon Verce *et al.* (2019), 11% des fragments séquencés d'un métagénome de kéfir de figues correspondent à l'espèce *O. sicerae*.

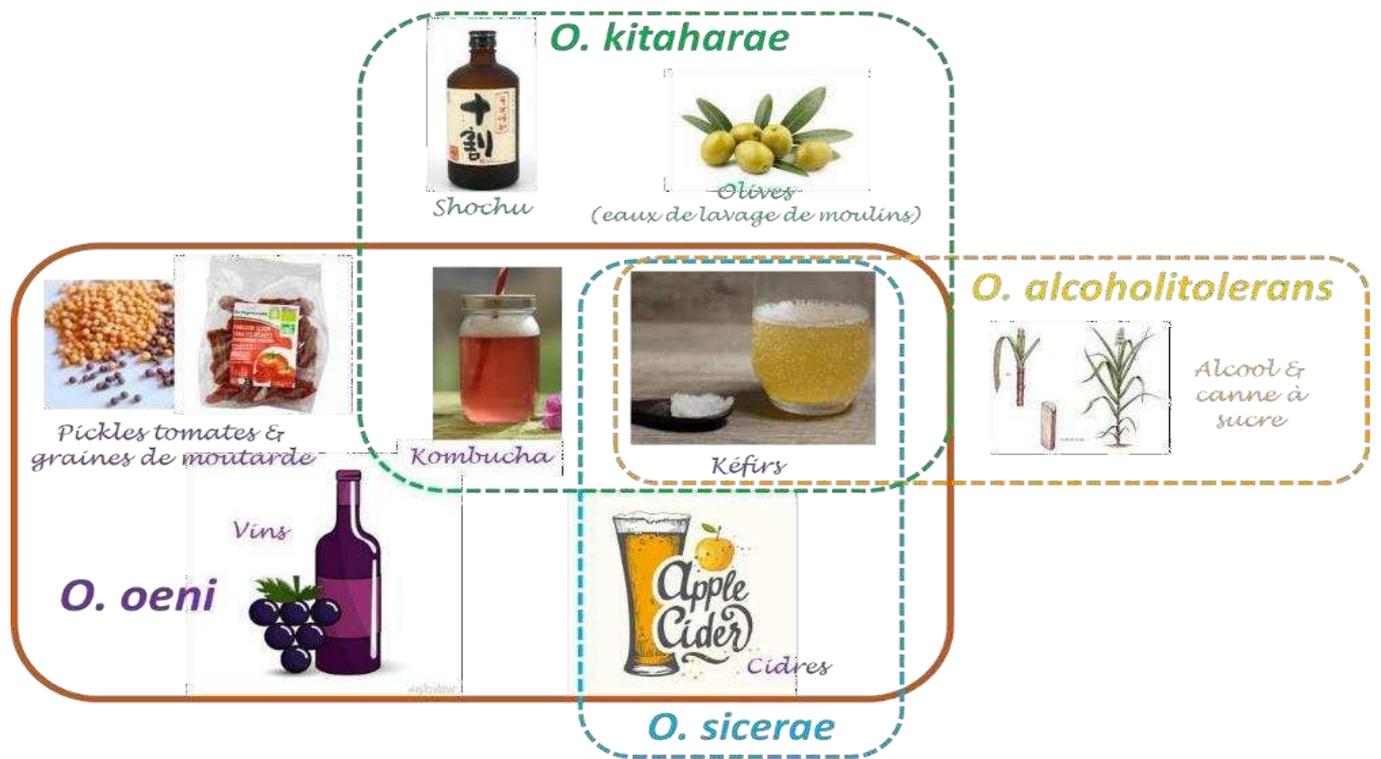


Figure 43 Représentation des aliments renfermant des oenocoques et des redondances de niche observées pour les 4 espèces décrites.

Chapitre II

**Les oenocoques affiliés à des espèces différentes
sont connectés via leurs phages**

Article

Phage Encounters Recorded in CRISPR Arrays in the Genus *Oenococcus*

Yasma Barchi, Cécile Philippe, Amel Chaïb, Florencia Oviedo-Hernandez , Olivier Claisse 
and Claire Le Marrec * 

UMR Oenologie 1366, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro,
Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 33882 Villenave d'Ornon, France

* Correspondence: clehenaff@enscbp.fr; Tel.: +335-57-575831

Abstract: The *Oenococcus* genus comprises four recognized species, and members have been found in different types of beverages, including wine, kefir, cider and kombucha. In this work, we implemented two complementary strategies to assess whether oenococcal hosts of different species and habitats were connected through their bacteriophages. First, we investigated the diversity of CRISPR-Cas systems using a genome-mining approach, and CRISPR-endowed strains were identified in three species. A census of the spacers from the four identified CRISPR-Cas loci showed that each spacer space was mostly dominated by species-specific sequences. Yet, we characterized a limited records of potentially recent and also ancient infections between *O. kitaharae* and *O. sicerae* and phages of *O. oeni*, suggesting that some related phages have interacted in diverse ways with their *Oenococcus* hosts over evolutionary time. Second, phage-host interaction analyses were performed experimentally with a diversified panel of phages and strains. None of the tested phages could infect strains across the species barrier. Yet, some infections occurred between phages and hosts from distinct beverages in the *O. oeni* species.

Keywords: fermented beverage; *Oenococcus*; bacteriophage; CRISPR; spacers; host spectra



Citation: Barchi, Y.; Philippe, C.; Chaïb, A.; Oviedo-Hernandez, F.; Claisse, O.; Le Marrec, C. Phage Encounters Recorded in CRISPR Arrays in the Genus *Oenococcus*. *Viruses* **2023**, *15*, 15. <https://doi.org/10.3390/v15010015>

Academic Editor: Dann Turner

Received: 16 October 2022

Revised: 10 December 2022

Accepted: 16 December 2022

Published: 20 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Grapes are currently the world's largest fruit crop. In 2020, the world area under vines, corresponding to the total surface area planted with vines for all purposes (wine, juices, table grapes and raisins) was estimated at 7.3 Mha [1]. Large parts of the collected fruits are turning to grape wines, which are among the most iconic fermented products worldwide. From an ecological point of view, fermenting wine is a complex and fluctuating environment, which is characterized by successional trajectories of distinct communities of microorganisms, which often represent a small part of the resident grape microbiota [2,3]. In most red and dry white wines, the process starts with the selection of the fruit and its fermentation into alcohol by yeasts (AF), followed by a malolactic fermentation (MLF), by which L-malic acid is decarboxylated to L-lactic acid. MLF serves several purposes: to reduce the harsh acidity of malic acid, give a concomitant modest increase in pH as well as increase wine microbial stability. This essential step to obtain high quality grape wines is commonly driven by the lactic acid bacterium (LAB) *Oenococcus oeni*. Formerly known as *Leuconostoc oenos*, the species was assigned to a new genus in 1991 and has long been the only known representative species [4]. It was later shown to occur naturally in other beverages such as ciders [5] and kombucha teas [6,7]. More recently, various inventories have expanded our knowledge of the horizons of the habitat of *O. oeni* to other niches such as water kefir and brine-type fermented foods [8], as well as fructose-rich environments including rotting fruits, fruit juices such as mango juice [9], coffee pulp [10] and beebread [11]. LAB from such fructose-rich niches have gained much attention in recent years and have a promising role in food fermentations [12]. Sister species have

been also progressively identified: *O. alcoholitolerans* from sugarcane fermentation vats of Brazilian distilleries producing bioethanol and Cachaça [13], *O. kitaharae* from composting residues of shochu distillates [14], kombuchas and water kefir [8], and *O. sicerae* from ciders and water kefirs [15,16]. Yet, relatively little is currently known about sister species relationships in the *Oenococcus* genus, and the evolutionary and ecological drivers that control the populations in their different and sometimes overlapping niches (water kefirs, ciders, kombuchas) need a better understanding for the further optimization of fermented-food production. Mobile genetic elements (MGE) such as plasmids, genetic islands and bacteriophages may be candidates for such forces. In particular, bacteriophages may profoundly influence their hosts through phage predation and phage-mediated horizontal transfer [17]. The real oenococcal phage diversity has yet to be fully appreciated. So far, only phages of *O. oeni* have attracted attention during winemaking. The bacterium interacts with a diversity of temperate [18,19], ex-temperate [20] and strictly lytic [21,22] bacteriophages in musts and wines (red, dry and sweet white wines, sparkling wines), which may lead to delayed or stuck MLF. All oenophages described so far have a tailed morphology with a dsDNA genome and belong to the *Caudovirales* order [23]. More than 95% of the known oenophages are temperate phages [24] and carry out site-specific recombination (SSR). The two major constituents of the SSR unit, corresponding to the phage integrases and attachment sites, have been studied in detail and this resulted in the clustering of prophages into six major groups (Int_A to Int_F), which are related to the integration site in the host chromosome [19]. The reconstructed phylogeny of all sequenced oenophages showed that the sequences segregated into three distinct and well-supported clusters. Cluster 1 comprises all temperate oenophages, except members of the Int_D group, which belong to cluster 2 and have been recently assigned to the new genus *Sozzivirus* [23]. Cluster 2 also harbours the strictly lytic Vinitor phages, which are related to a prophage in the gut-associated LAB *Convivina intestini* [22].

Strains of *O. oeni* can defend themselves against viral infections with diverse antiphage mechanisms, such as restriction-modification and superinfection exclusion systems, which have been identified by whole genome sequencing [24]. Yet, CRISPR-Cas adaptive defence mechanisms [25] are lacking conserved homologs in the sequenced strains of *O. oeni* [24,26]. CRISPR-Cas systems are unevenly distributed across taxa and environments, and recent analyses have shown that less than half of mesophilic bacteria have CRISPR arrays [27,28]. More importantly, bacteria with high mutation and slow growth rates, such as *O. oeni* [26,28], are much less likely to evolve CRISPR-based immunity [29–31]. The situation in the sister species, namely *O. sicerae*, *O. kitaharae*, and *O. alcoholitolerans* stands in sharp contrast to that of *O. oeni*, and the presence of CRISPR-Cas loci has been documented in strains of all three species [4,26,32]. Even though no detailed exploration of these loci has been conducted, their presence raises interesting questions regarding the conditions for establishing and maintaining CRISPR-mediated adaptive immunity amongst oenococci.

The CRISPR-Cas system is composed of clustered, regularly interspaced, short repetitive elements (direct repeats) separated by unique sequences (spacers) matching foreign DNA and an operon of *cas* genes that encode for proteins that process the crRNA and cleave DNA targeted by the spacers. Spacer acquisition is the first step of the CRISPR-Cas mechanism, named ‘adaptation’ or ‘immunisation’ [27]. Importantly, sequence identity between the spacers and cognate protospacers (on the phages genomes or other MGE) is required for immunity [25]. CRISPR arrays therefore contain a record of previous encounters with phages in the sequence of their spacers. In addition, position in the array and the number of nucleotide mismatches with host protospacers hint at the elapsed evolutionary time since a phage and its host last interacted. Therefore, spacer sequences may provide a historical perspective on foreign DNA exposure by oenococcal hosts and thereby can be used as an indicator of their evolution [33,34].

As two more whole-genome sequences from kefir-associated strains (*O. sicerae* and *O. kitaharae*) recently became available [16,35], we set out to analyse and compare the genomic sequences of the CRISPR elements (repeats, spacers and Cas proteins) among

oenococci, offering a powerful tool for investigating phage–host interactions. Our data will provide new insights to the evolution and impact of phage specificity within complex bacterial communities associated to fermentations.

2. Material and Methods

2.1. Bacteria and Culture Conditions

Six strains were obtained from the Oenological Biological Resource Center (CRBO, ISVV, Villenave d’Ornon, France). They include four *O. oeni* strains, including IOEBS277 (red wine), CRBO1381 and CBO1384 (cider), and BL4 (kombucha), and two *O. kitaharae* strains associated with water kefir (CRBO2176) and Shochu (NRIC0649).

Strain *O. alcoholitolerans* JP736 was kindly provided by Prof. Marcos Morais (Federal University of Pernambuco, Brazil), and *O. sicerae* UCMA15228 was purchased from the DSMZ Culture Collection.

All strains were grown in MRS broth adjusted to pH 4.8 (Man Rogosa Sharpe) (Difco, Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France) at 25 °C. When requested, agar 1.6% (wt/vol) was added. All media were heat or filter-sterilized.

2.2. Phage Lysates Used in the Study

Five previously characterized oenophages were used in this study. OE33PA is an ex-temperate phage that harbours an Int_B-type integrase sequence [18,20]. Vinitor (162, 27 and 28) and Krappator 27 are strictly lytic phages [21,22]. They were isolated from wine samples and propagated on strain *O. oeni* IOEBS277 to obtain high titre lysates, which were stored at 4 °C, as previously described [18]. Strain IOEBS277 does not contain endogenous phages and is sensitive to all oenophages so far isolated in our laboratory [19]. The accession numbers of the four phages are given in Table S1.

A set of 30 partially characterized temperate oenophages were collected from wine samples during recent surveys [21,36]. They were available as phage lysates and stored at 4 °C.

2.3. PCR Identification of of Lysogenic Strains

Assessment of lysogeny in three unsequenced bacterial strains, BL4, CRBO14221 and CRBO14223, was obtained as follows. Bacterial DNA was prepared and used as the template in six PCR tests that distinguish the Int_A, Int_B, Int_C, Int_D [18,21], Int_E and Int_F groups [36] among oenophages, based on their integrase (int) sequence. A Biorad i-Cycler was used for the amplification reactions, which were achieved in a 25 µL volume using the Bio-Rad Taq PCRMaster Mix kit and 0.2 mmol/L of each primer. All oligonucleotides were purchased from Eurofins MWG-Operon (Munich, Germany) and are available in Table S2.

2.4. Mitomycin C Induction of Lysogenic Strains

Phage induction by mitomycin C (MC) was examined in lysogenic strains of *O. oeni* (CRBO14221, CRBO14223, and BL4), *O. sicerae* UCMA15228 and *O. alcoholitolerans* JP736. Cells were grown until an OD₆₀₀ of 0.2 and added with MC 1 µg/mL for *O. oeni* and *O. alcoholitolerans*, and 0.5 µg/mL for *O. sicerae*. Following lysis, the cultures were cleared of cellular debris by centrifugation (30 min, 5000 × *g*, 4 °C). The supernatant was then filtered through a 0.2 µm pore size sterile filter and stored at 4 °C.

2.5. Host Spectrum Determination

Ten-fold serial dilutions of the phage lysates were prepared in phage buffer (50 mM TRIS HCl pH 7.5; 0.1 M NaCl; 8 mM MgSO₄). The phages were enumerated on indicator strains using the MD/SP (Multiple Dilutions on Single Plates) method [37] on MRSΦ agar [18]. Tested strains were IOEBS277, CRBO1381, CRBO1384 and BL4 (*O. oeni*), CRBO2176 and DSM17330 (*O. kitaharae*), UCMA15228 (*O. sicerae*) and JP736 (*O. alcoholitolerans*). Bacteria were grown to exponential phase, and 200 µL of the bacterial culture was mixed in 5 mL of top MRSΦ agar and poured onto MRSΦ agar plates. Spot assays were performed using 8 µL of the purified phage and the diluted samples. Incubations were carried out under

anaerobic conditions (AnaeroGen; Oxoid) at 25 °C for 3–7 days to allow plaque formation. The presence of individual plaques was recorded as a positive test.

When phage lysates only revealed clear lysis in the first two dilution spots, with no individual plaques, nor any sign of lytic activity in further dilution spots, the lysate was dialyzed (Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 dialysis tubing MCWO 100 kDa) against MRS broth (3 × 4 h) and subsequently against phage buffer (1 × 4 h). Pure and ten-fold diluted samples were tested using a DAL (Double Agar Layer) method. A volume of 100 µL of phage sample was mixed with the bacterial culture in soft agar and poured on MRSΦ agar. In the DAL method, the phage particles proliferate in the soft agar, while bacteria are fed from the underlying solid agar [37].

2.6. Genome Sequencing

Purification of the prophages from strains CRBO142221 and CRBO14223 was done using MC-induced cultures (50 mL). Phage OE33PA6 was propagated on strain IOEBS277 at a multiplicity of infection of 0.01.

The three phage lysates were centrifuged (30 min, 5000× *g*, 4 °C), and the supernatants were filtered. The phage particles were concentrated by ultracentrifugation, and double-stranded DNA was extracted as described previously [38]. Whole-genome sequencing was performed at the Genome-Transcriptome facility of Bordeaux. DNA libraries were prepared using the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Genomic DNA was sequenced using an Illumina MiSeq using 2 × 250 bp paired-end libraries. Reads were assembled using SPAdes [39] with default parameters (read correction and assembler). The genome sequences of the three phages were submitted to GenBank, and their accession numbers are given in Table S1.

2.7. Bioinformatic Analysis

The complete genome of 187 prophages was recently retrieved from 134 GenBank genomes [19]. Most analysed lysogens ($n = 86$) harboured a single prophage, and 48 polylysogens contained two ($n = 43$) or three ($n = 5$) prophages. Strains were collected worldwide from different fermented beverages (red, dry and sweet white wines, sparkling wines, and more recently, cider and kombucha tea). We also included the two single prophages found in CRBO14221 and CRBO14223. All accession numbers and tRNA insertion sites where prophages are integrated in the chromosome of lysogens are given in Table S1. This constitutes our main data set of 189 prophages.

Predicted functional categories were associated with all available phage genes using the RAST pipeline [40]. The *in silico* translated protein sequences were used as queries to search for sequence homologs in the non-redundant protein database at the National Centre for Biotechnology (including the viral genome database). Deduced proteins were searched for function using BLAST v2.10.0 and a cutoff E value of 0.001. Searches for distant homologs were performed using HHpred [41] against different protein databases, including PFAM (Database of Protein Families), PDB (Protein Data Bank), CDD (Conserved Domains Database) and COG (Clusters of Orthologous Groups), which are accessible via the HHpred website.

Phage genome comparisons were conducted using the Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) method using VICTOR [42] under settings recommended for prokaryotic viruses [43] at: <http://ggdc.dsmz.de/phylogeny-service.php> (accessed on 6 October 2022). The resulting intergenomic distances were used to infer a balanced minimum evolution tree with branch support via FASTME, including SPR postprocessing for each of the formulas D0, D4 and D6. Branch support was inferred from 100 pseudo-bootstrap replicates each. Trees were rooted at the midpoint and visualized with FigTree as already described [22].

2.8. Typing System for Rapid Assessment of Diversity amongst Uncharacterized Oenophages

The phylogeny of temperate, ex-temperate and strictly virulent phages showed (i) the presence of similar prophages in distinct strains, (ii) the extensive modularity of phage

genomes and (iii) the segregation of phages into distinct and well-supported clusters [19,24]. Taking as input the set of 189 available prophage genomes, as well as the four newly sequenced oenophages OE33PA and Vinitor 162, 27 and 28 [21,22], we identified diverse genetic loci, whose presence or absence could rapidly group the so far uncharacterized oenophages isolated during previous surveys.

We focused on five main categories, in which we targeted six unique and essential functions: lysogeny establishment and maintenance (Integrase, *int* and LexA- or Cro/CI-type repressor proteins, LM) [19], replication (replisome initiator protein, Rep), head morphogenesis (Small Terminase unit, TerS) and encapsidation (Tape Measure Protein, TMP) [36]. Last, we retained a toxin (Doc), which was part of a putative toxin–antitoxin system occasionally localized in the moron module of a few phages, including that of OE33PA [20]. For each of the six targeted proteins (*Int*, LM, Rep, TerS, TMP, Doc), sequences from the 193 oenophage genomes were aligned using ClustalOmega at <https://www.ebi.ac.uk> (accessed on 20 September 2022). The multiple sequence alignments resulted in the identification of groups of conserved sequences in the amino acid sequences (>90% identity) in related phages. Visual examination of the alignments produced with ClustalOmega revealed blocks that contained invariant regions suitable for primer prediction using Primer3 [44]. The list of primers used in this study is given in Table S2.

2.9. CRISPR-Cas Systems and Anti-CRISPR Identification

All data were analysed for the presence of CRISPRs and *cas* genes with the use of the CRISPRCasFinder program with default parameters [45], which enables the identification of direct repeat consensus boundaries and the extraction of related spacers and *cas* genes. A multi-FASTA file containing the unique spacers identified in each species (*O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* and *O. kitaharae*) was used as a reference to blast a customised database of selected plasmids ($n = 5$) and phages ($n = 34$) of *O. oeni*. We performed a command-line NCBI-BLASTN, with 85% identity and 90% query coverage. Next, a BLAST search of the identified spacers against the original dataset of 193 oenophages was done and did not retrieve additional spacers. Each matching protospacer identified in a given phage was also manually compared to the most related phage genomes in the database, in order to identify putative additional mutations.

Maximum likelihood phylogenetic trees of Cas proteins were constructed using the PhyML algorithm at <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/> [46], the latest version of which includes automatic selection of the best-fit substitution model for a given alignment. A Bayesian-like transformation of aLRT (aBayes), as implemented in PhyML, was used to estimate branch support.

Finally we analysed genomes of *O. sicerae* for the presence of anti-CRISPR (Acr) encoding genes. They often have an immediate downstream gene coding for a putative transcription regulator, named the Aca (Acr associated) protein. Such Acr-Aca loci were searched for in the genome of *O. sicerae* UCMA15558 using the Acr Database [47].

3. Results and Discussion

3.1. Distribution and Architecture of CRISPR Loci in the Genus

Whole-genome sequencing analysis of strains collected from wine, cider and kombucha have repeatedly confirmed the lack of CRISPR-Cas mechanisms in the *O. oeni* species [4,26,32]. In this study, we set out to better understand the native interspecies occurrence of CRISPR in three novel oenococcal species: *O. sicerae*, *O. kitaharae* and *O. alcoholitolerans*. To this aim, the genomes of five strains available from the NCBI GenBank Database (*O. alcoholitolerans* UFRJ-M7.2.18^T, *O. sicerae* UCMA15228^T and OAL24, *O. kitaharae* DSM17330^T and CRBO2176) were analysed with CRISPRCasFinder. A single CRISPR array was identified in the chromosome of *O. alcoholitolerans* UFRJ-M7.2.18 (Figure 1). We also observed that plasmids possessed very questionable CRISPR in this strain, containing some direct repeats (DR) with no associated *cas* genes (Table S3). These loci are likely reminiscent of degenerate and non-functionable systems. Consistent with

a previous report [32], we successfully detected a single CRISPR system in *O. kitaharae* DSM17330^T and two arrays in *O. sicerae* UCMA15228^T (Figure 1). The coexistence of several CRISPR-Cas systems in the same genome has been previously described in several food LAB and bifidobacteria [48–50].

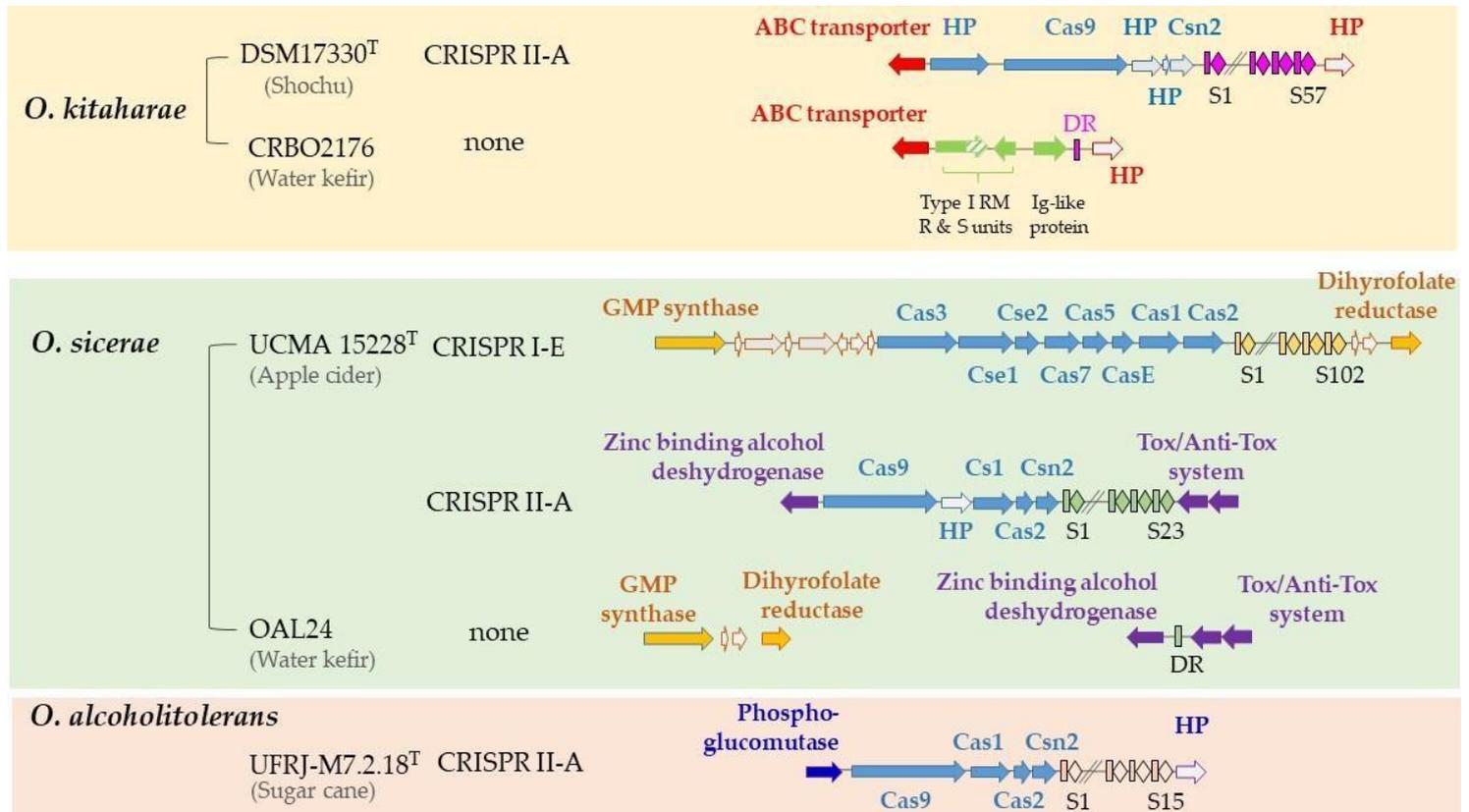


Figure 1. Distribution and architecture of CRISPR loci in the *Oenococcus* genus. Direct repeats (DR) and spacers are represented by rectangles and lozenges. Genes coding for hypothetical proteins (HP) are in grey. Double slash marks represent DNA regions that are not shown. Sequence ID for the restriction endonuclease R and S subunits and putative Ig-like proteins in *O. kitaharae* CRBO2176 are MCV3295975.1, MCV3295974.1 and MCV3295973.1, respectively.

CRISPR-Cas systems are classified into six types and more than 30 subtypes based on phylogeny and use of different *cas* genes [27,28]. As summarized in Figure 1, arrays that contained the Cas9 endonuclease and Csn2 protein signatures of type II-A CRISPR loci were identified in *O. alcoholitolerans* UFRJ-M7.2.18, *O. kitaharae* DSM17330 and *O. sicerae* UCMA15228. These observations are consistent with recent findings that type II systems are widespread among LAB [27,48]. Top BLAST Hits (TBH) for the Cas9 proteins in the three tested strains were retrieved and used to construct a phylogenetic tree, which is provided in Figure S1. The sequence in *O. kitaharae* was more closely related to that of *O. alcoholitolerans* and had 47% identity with the Cas9 protein of *Leuc. pseudomesenteroides* (e-value 0). In contrast, the Cas9 protein from *O. sicerae* was closer to that of *Fructobacillus trophaeoli* (E value 0; 45% identity).

Interestingly, a second CRISPR-Cas system was found in *O. sicerae*. It was classified as a type I-E array and was larger than the type II system. This is due to the fact that type I uses multiple Cas protein complexes for interference, whereas type II systems only use Cas9 proteins [27]. The nuclease Cas3 is the hallmark protein of type I systems, and the TBH of the protein in *O. sicerae* was identified in *Lactiplantibacilli* (E value 0; 58% identity; Figure S1). The widespread occurrence and efficient use of type I-E CRISPR-Cas systems to edit various chromosomal loci in LAB have been recently documented [48].

Strikingly, CRISPR-Cas systems were absent in *O. sicerae* OAL24 and *O. kitaharae* CRBO2176, which were both isolated from water kefir. As illustrated in Figure 1, pairwise genomic comparisons of each strain with the corresponding type strain (*O. sicerae*

UCMA15228 and *O. kitaharae* DSM17330) led to the identification of a signature consisting of a single DR, suggesting the deletion of the whole type II-A CRISPR arrays in both OAL24 and CRBO2176.

Rearrangements that are more complex are suggested in *O. kitaharae* CRBO2176 and are illustrated by the insertion of three extra open reading frames (Figure 1). A partial type I RM system was found with putative *hsdR* (endonuclease) and *hsdS* (specificity unit) genes with head-to-head gene organization. No *hsdM* gene was found in the locus. The putative HsdS protein had 73% identity to similar systems in *Leuconostoc sp* C2 (CP002898.1) and *Leuc. kimchii* (CP037939.1), which were both isolated from homemade kimchi [51]. The HsdR protein was formed by two domains. The N-terminus (271 aa) had 85% identity to an HsdR protein in *O. sicerae* UCMA15228 (QAS70346), while the C-terminus (92 aa) had 99% identity to the C-terminal domain of a phage integrase (QAS70349) affiliated to the same bacterium. The third gene of interest in CRBO2176 was related to an Ig-like surface protein. HHPred analyses predicted the presence of a choline binding domain (C-terminal segment 120–270 aa) resembling a vaccinal antigen in *S. pneumoniae* (4CP6-A; prob. 99.36; E value 8×10^{-10}). Our observations made in strain CRBO2176 suggest extensive recombination events within the CRISPR-Cas region in *O. kitaharae* and possible association of the system with prophages, as reported in other bacterial models [52]. In *O. sicerae* OAL24, a full deletion of the type I CRISPR-Cas systems occurred without leaving evidence of its past presence in the genome.

Each of the four confirmed CRISPR arrays in *O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* and *O. kitaharae* consisted of several exact DR of different sizes, ranging from 29 to 36 nucleotides (Table 1). The whole DR sequences in *O. alcoholitolerans* and *O. kitaharae* were identical (Table 1), although such sequences are often species specific [27].

Table 1. Characteristics of CRISPR arrays in the *Oenococcus* genus.

CRISPR Loci		DR			Spacers		
Species	Type	Size (bp)	Sequence	Size (bp)	Total	Unique	With Matches in <i>O. oeni</i>
<i>O. kitaharae</i> DSM17330 ^T	II-A	36	GCTTCAGATGTGTGTCAGATCAATGAGGTAGAACCC	30	57	56	3
<i>O. sicerae</i> UCMA15228 ^T	II-A	36	GGGTGTCACCCCATTAATCTGACATACA AACTGAAGC	29–31	23	21	2
	I-E	29	AGGATCACCCCGCTTGTGCGGGAATAC	32–33	102	91	5
<i>O. alcoholitolerans</i> UFRJ-M7.2.18 ^T	II-A	35	GCTTCAGATGTGTGTCAGATCAATGAGGTAGAACC	30–31	15	15	0

A total of 197 spacers was identified, and their full list is given in the Supplementary Materials (Table S3). We observed repeated blocks of spacers in *O. sicerae* UCMA15228, and to a lesser extent in *O. kitaharae* DSM17330, which possibly resulted from duplications [27]. Consequently, the number of unique spacers was slightly smaller in both species, and respective ratios of unique/total spacers of 0.89 and 0.98 were found. We also analysed the spacer repertoire relatedness between the four arrays and found a complete replenishing of the four loci with unique spacers.

Typical arrays usually contain fewer than 50 spacers in bacteria [53]. Accordingly, the repertoire associated with the type II systems in *O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* and *O. kitaharae* contained 15, 23 and 57 unique spacers, respectively (Table 1).

Contrasting occupancy of the type I CRISPR locus was observed in *O. sicerae* UCMA15228 in that the array contained 102 spacers. As mentioned earlier [54], the number of spacers in an array is a result of a compromise between better protection offered against abundant, diverse and faster evolving viruses by a larger spacer repertoire and a higher physiological cost of maintaining a longer array.

Overall, the presence of 125 spacers in *O. sicerae* UCMA15228^T is intriguing and implies that the strain frequently comes under attacks by phages during the cider fermentation pro-

cess. *Oenococcus* sp. and lactobacilli are the most common and dominant LAB identified in the bacterial communities of apple juice by-products [55]. Yet, Ledormand and co-authors recently failed to isolate phages infecting *Oenococcus* sp. from a set of 120 samples (cider, apple must, crushed apples), and a single strictly lytic phage infecting *Liquorilactobacillus mali* was isolated [56]. Moreover, deep-sequenced DNA viromes of ciders did not lead to the recovery of viral sequences related to oenophages [57]. An early collection of the cider samples that took place before the onset of MLF may explain the obtained results.

As shown in Table 1, the type strains of *O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* and *O. kitaharae* harbour four chromosomal CRISPR loci, which account for a total of 183 unique spacers (Table S3). Based on the signature genes and gene arrangements, two types (I-A and II-E) were identified. Despite limited availability of bacterial genomes in each species, our study (i) confirms an uneven distribution of CRISPR-Cas immune systems in the *Oenococcus* genus, with the *O. oeni* species devoid of such viral defence systems, and (ii) also suggests within-species variability. The later observation has also been reported in *S. thermophilus* and Lactobacilli [27,34,48]. Additional studies are now needed to better understand the variation in the existence, number and functionality of CRISPR-Cas systems in oenococci. An interesting question will be to assess whether fluxes in the function, acquisition by horizontal gene transfer and deletion of CRISPR-Cas loci occur as a strategy to cope with different habitats, especially when phages are a major source of mortality.

3.2. Selection of Representative MGE of *O. oeni* for Interspecies CRISPR Targeting

Our objective was to generate a set of representative and non-redundant viral and plasmid sequences to be used for interspecies CRISPR targeting. We first made a comparative analysis of the full genome sequences of oenophages to identify phage cluster relationships and focused on a limited number of phage genes and their deduced proteins. As a second step, the analysis provided a rapid typing system to screen for substantial novelty and diversity in a collection of 30 uncharacterized phages that have been collected over the past years in our laboratory [18,21,36].

The relationship between the integrase and TMP sequences and phage clustering has been proposed for wine associated oenophages [18,19,36]. In this study, we expanded our system to additional proteins (LM, Rep, TerS and Doc) to improve the phage-typing discriminatory power of our scheme. To this aim, comparisons of whole genome sequences were performed. They included 189 prophages, Vinitor phages (162, 27 and 28) and OE33PA (Table S1). This analysis revealed that proteins encoded by divergent genes could perform analogous functions, depending on the phage (Figure 2). Hence, we identified a set of seven distinct classes of proteins associated with a TMP function (TMP 1–7), providing a direct view of the modular and combinatorial nature of oenophage genomes. Six types of integrase (A to F) and immunity repressor (LM 1–6) and seven types of terminase (TerS 1–7) were also identified. Replication modules had five distinct organisations. Each was represented by a specific protein specifying either a RecA-like ATPase (Rep1), an helicase (Rep2), a DUF1351 domain-containing protein (Rep3), an excinuclease (Rep4) or a phage replisome organiser (Rep5). Last, we retained a toxin (Doc), which was part of a putative toxin-antitoxin system occasionally localized in the moron module of a few phages, including that of the Int_A prophage of strain IOEB0608.

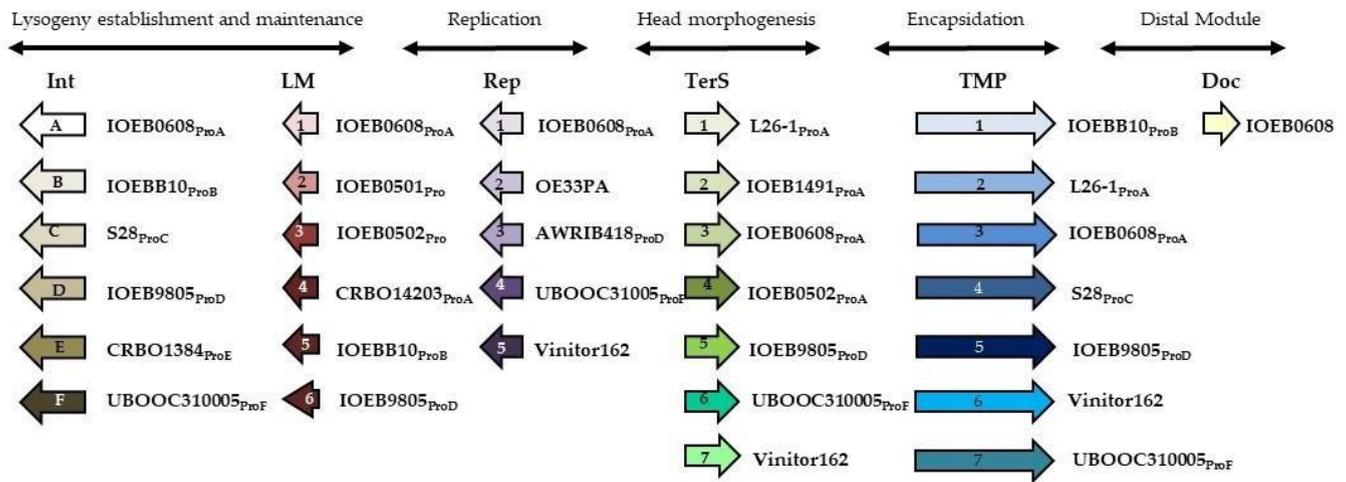


Figure 2. Scheme for the classification and rapid genotyping of oenophages. LM, lysogeny maintenance; Rep, replication-associated protein; TerS, small unit of the terminase; TMP, tape measure protein; Doc, toxin–antitoxin system. Representative phages containing the genes encoding the distinct proteins are indicated. Pro indicates that the phage is a prophage. Because some strains are polylysogens, the integrase type (A to F) is also indicated.

From our *in silico* analysis, each phage genome was associated with a barcode corresponding to its cognate TMP, TerS, integrase, LM, Rep and presence/absence of Doc proteins. Our queries identified 27 distinct patterns among the 193 phages analysed (Table S4). A representative phage for each pattern was selected for further analysis. In a few cases, two or three phages sharing the same pattern were included in our study, as they originated from different steps and/or wine types, yielding a final set of 33 phages.

For each of the 32 conserved phage proteins of the scheme (6 Int, 6 LM, 5 Rep, 7 TerS, 7 TMP, 1 Doc), all available nucleotide sequences were compared in order to design primers. They were used for screening our collection of poorly characterized phages. OE33PA6 was the only phage showing an original combination of sequences (Int_A, LM₁, Rep₁, TerS₂, TMP₁, Doc₋) compared to the 27 identified patterns. The genome of phage OE33PA6 was sequenced (Table S1) and added to our set of oenophage genomic data, which accounted for 34 members. Of note, the limited novelty in the analysed set of uncharacterized oenophages confirms that free replicating particles in wines are mostly temperate oenophages, resulting from excision of the prophage genome out of the chromosome of lysogens [36].

Additional data to input to the database were plasmids, which are frequently targeted by CRISPR arrays. Five sequences in *O. oeni* were included in our queries: pOeni1 and pOeni2, which replicate using a rolling-circle mechanism [58], pRSE2 and pRSE3, which use a theta mode of replication [59], and a large plasmid recently found in strain AWRIB429 [60].

3.3. Intra- and Interspecies CRISPR Targeting of Known Prophages and Plasmids of *Oenococcus oeni*

To evaluate the protection by CRISPR-Cas systems against the foreigner nucleic sequences, we performed a command-line NCBI-BLASTn with 85% identity and 90% query coverage against our local database of *O. oeni* phages ($n = 34$) and plasmids ($n = 5$) with the 183 unique spacer sequences extracted from the CRISPR arrays found in *O. alcoholitolerans*, *O. sicerae* and *O. kitaharae*. Eleven spacers were found as protospacers in viral and plasmid sequences of *O. oeni*, consistent with the CRISPR-Cas function as a protective immune system against acquiring foreign nucleic sequences (Table 2). None of these identified spacers had 100% identity to the targeted MGE in *O. oeni*, and one to four distinct mismatches were observed between spacers and protospacers (Table 2). A single protospacer was present in plasmids pOeni1, pOeni2 and pAWRIB429.

Table 2. List of the unique protospacers found in MGE from *Oenococcus sp.* (phage or plasmid) and function of the genes targeted by CRISPR systems.

Type	Sequences of Spacers (SP), Protospacers and Relevant Phages	Phage/Plasmid Functions Targeted by CRISPR Systems	
II <i>Ok</i>	SP _{OKII2} IOEB1491 _{ProA}	ATAATCACCCAGCTAGGATTTGTACATGGC A C C T	Dit (phage baseplate protein, WP_032824876)
	SP _{OKII9} IOEB1491 _{ProA}	TGATACGATTGACTTTCAATATCACCAAAC T G	
	SP _{OKII15} pOeni1/2; pAWRIB429	GCAACGAATAGGCCGTACCGACCTATTTCGT C	Intergenic sequence
II <i>Os</i>	SP _{OSII1} Vinator27	AGAAATTTTGGAAATTTATATAATCACAAAG G	Rep5 (Replication initiation protein QNO11543)
	SP _{OSII21} S161 _{ProA}	TATCTGACGCTGTTGGTATACAAGTCACAA C A	Tal (peptidase, KGH92654)
I <i>Os</i>	SP _{OSI5} IOEB0501 _{ProA}	CGATTGACATTGTCGTTCCGGCATGATCCGACT A T	Head closure protein (WP_002820745)
	SP _{OSI7} S161 _{ProA}	TGTGCTGCTCATGGCTTTCGTCATGACTTTACC T	TMP2 (KGH92652)
	SP _{OSI43} IOEB0205 _{ProA}	ATTA AACGTA AATATAACATTCTAAAAGCAG A	HP (WP_002825766)
	SP _{OSI46} IOEB0501 _{ProA}	GATCCGTTGCATGATTCTTATGCAGCTGCCTT A C	Portal protein (WP_032822098)
	SP _{OSI78} S161 _{ProA}	AACAACCTAACAGAATTAATCGGTGGCCTGTT T	Bifunctional DNA primase/polymerase (WP_002824107)
	SP _{OSI89} S161 _{ProA}	TTTTTCTAGTTCTGATAACTAAGTCAGAATTACC G A G G	
	STS _{OSI30} Resident prophage	AATGTGCTTGATTCAAGCTATGGCAATGACTC	Transglycosylase soluble domain- containing protein
	STS _{OSI36} Resident prophage	CCCACCAGCTGTCTGGCATTGAGATAGTTCGT	Tyrosine-type recombinase/integrase (QAS70227)
	STS _{OSI86} Resident prophage	ATTATTAGGACGAGGGACTCCGATGGTGAAC	Tal (WP_243148548)
	STS _{OSI87} Resident prophage	ACCATCGTTTGATAAGTCGAGCTCTCAACTTT	
STS _{OSI9} Resident prophage	CAAGAAGTCCACTAATCACTGTCGTCGCAGC		

Ok, *O. kitaharae*; *Os*, *O. sicerae*; I and II refer to the types of CRISPR-Cas systems; SP, spacers; STS, self-targeting spacers; Dit, distal tail protein; Rep, replication-associated protein; Tal, tail-associated lysin; TMP, tape measure protein.

Importantly, we assessed whether CRISPR may also target the backbone of the chromosome of *O. oeni*. We analysed the genome data of 33 lysogens harbouring the prophages that were retained in our set of oenophages. No additional targeting was identified along the entire length of their chromosome, including the regions harbouring remnant phages [19]. Similar data were obtained with non-lysogenic strains of *O. oeni* [19].

The CRISPR-Cas system in *O. alcoholitolerans* showed no spacer matching with *O. oeni* phages or plasmids. All eleven spacers matching *O. oeni* phage or plasmid protospacers were identified in *O. kitaharae* (SP_{OKII2}, SP_{OKII9} and SP_{OKII15}) and *O. sicerae* (SP_{OSII1}, SP_{OSII21}, SP_{OSI5}, SP_{OSI7}, SP_{OSI43}, SP_{OSI46}, SP_{OSI78} and SP_{OSI89}) (Table 2). Their abundances were inversely correlated with phylogenetic distances between *O. oeni* and its sister species [15].

Many spacers were found in middle and leader distal positions in each of the three arrays (Table 2). Yet, five spacers (SP_{OKII2}, SP_{OKII9}, SP_{OSII1}, SP_{OSI5}, SP_{OSI7}) were shown to locate in the leader proximal positions in their respective array. As documented in the past, spacers integrated into the 5' end are more recently acquired compared to those at the

3' end [33]. In *O. sicerae*, the fraction of detected protospacers was higher for the type I than for the type II CRISPR-Cas system. In addition, there may be a priority among oenococcal strains to select the type II CRISPR system against virulent phages as well as plasmids.

The findings that ten spacers in *O. kitaharae* and *O. sicerae* specifically targeted phages of *O. oeni* may reflect movement between the species and supports various host–phage interactions in the *Oenococcus* genus. Yet, the majority of the spacers in the three identified arrays remain uncharacterized and correspond to the so-called « CRISPR dark matter » in *O. kitaharae* and *O. sicerae*. We next investigated whether these congeneric species that inhabit diverse environmental settings were also connected to other LAB species through bacteriophages. To this aim, we looked for matches to genomes from different microbial taxa in the Genbank databases. We found that the repertoires associated with type II-CRISPR arrays lacked detectable homologues in the GeneBank nucleotide database. Yet, a single spacer in the type I array in *O. sicerae* (SP_{OSI}32, 5' TTTCATTTAAATATGCATGCTGATGATGACGG 3') matched various phage sequences, with one or two mismatches. All protospacer-containing genes encode a phage replisome organizer protein. The matches include a bacteriophage sp. isolate named ctsqZ15a, associated with human metagenomes [61], as well as a variety of prophages in *Lactiplantibacillus plantarum* (most lysogenic strains originated from kimchi, dairy products, beer and healthy infant faecal samples) and *Liquorilactobacillus mali* (strain LM596 from apple juice from cider press) (Figure 3, Table S1).

We conclude that the high prevalence of orphan spacers in *O. kitaharae* and *O. sicerae* implies the existence of a large number of undiscovered phages, plasmids, ICE or other sequences in the bulk of the genetic landscape of MGE among oenococcal species, which remains to be discovered. This would also suggest that local phages that most frequently infect the tested strains of *O. kitaharae* and *O. sicerae* in their respective environment (Shochu and apple cider, respectively) would be phylogenetically distinct from the currently characterized wine-associated oenophages. Alternately, the limited number of spacer matches could be attributed to the presence of substantial plasmids or phages that constantly evolve, resulting in them escaping from the mechanism.

3.4. Autoimmunity in *O. sicerae*

One of the potentially detrimental costs associated with CRISPR-Cas viral defence is autoimmunity, which arises when CRISPR arrays acquire spacers that target the host genome; this is often thought to be lethal [27]. BLASTn comparisons of spacers from *O. kitaharae* DSM17330 and *O. sicerae* UCMA15228 against their respective whole genome sequences revealed five additional self-targeting spacers (STS) in *O. sicerae* UCMA15228 and none in *O. kitaharae* (Table 2).

All STS in *O. sicerae* UCMA15228 were located in the type I CRISPR array (SP_{OSI}30, SP_{OSI}36, SP_{OSI}86, SP_{OSI}87 and SP_{OSI}98) and had 100% sequence identity to a 45.3 kb prophage integrated in a 16-bp sequence (5'ACTCCTGTTCCGGGCA3') at the 3' end of a tRNA^{Leu} gene (Table S1). The culture was observed to lyse in the presence of mitomycin C 0.5 µg/mL, suggesting the ability of the prophage to excise and produce bacteriophage particles. Interestingly, the vicinity of the locus used for site-specific recombination in *O. sicerae* is similar to that of the *attB_B* used by Int_B prophages in *O. oeni* [19]. Salient features of the identified prophage are the presence of genes specifying a tRNA and a putative potassium voltage-gated channel subfamily KQT (ORF4) (Figure 4). A BLASTp search against non-viral organisms revealed a putative K⁺ channel protein from various *O. oeni* and *O. kitaharae* strains as the most similar proteins (E values e−115 and e−100, 89 and 88% aa identity in *O. kitaharae* DSM17330 and *O. oeni* CRBO1395, respectively). The corresponding regions are not assumed to be mobile in these bacteria [19].

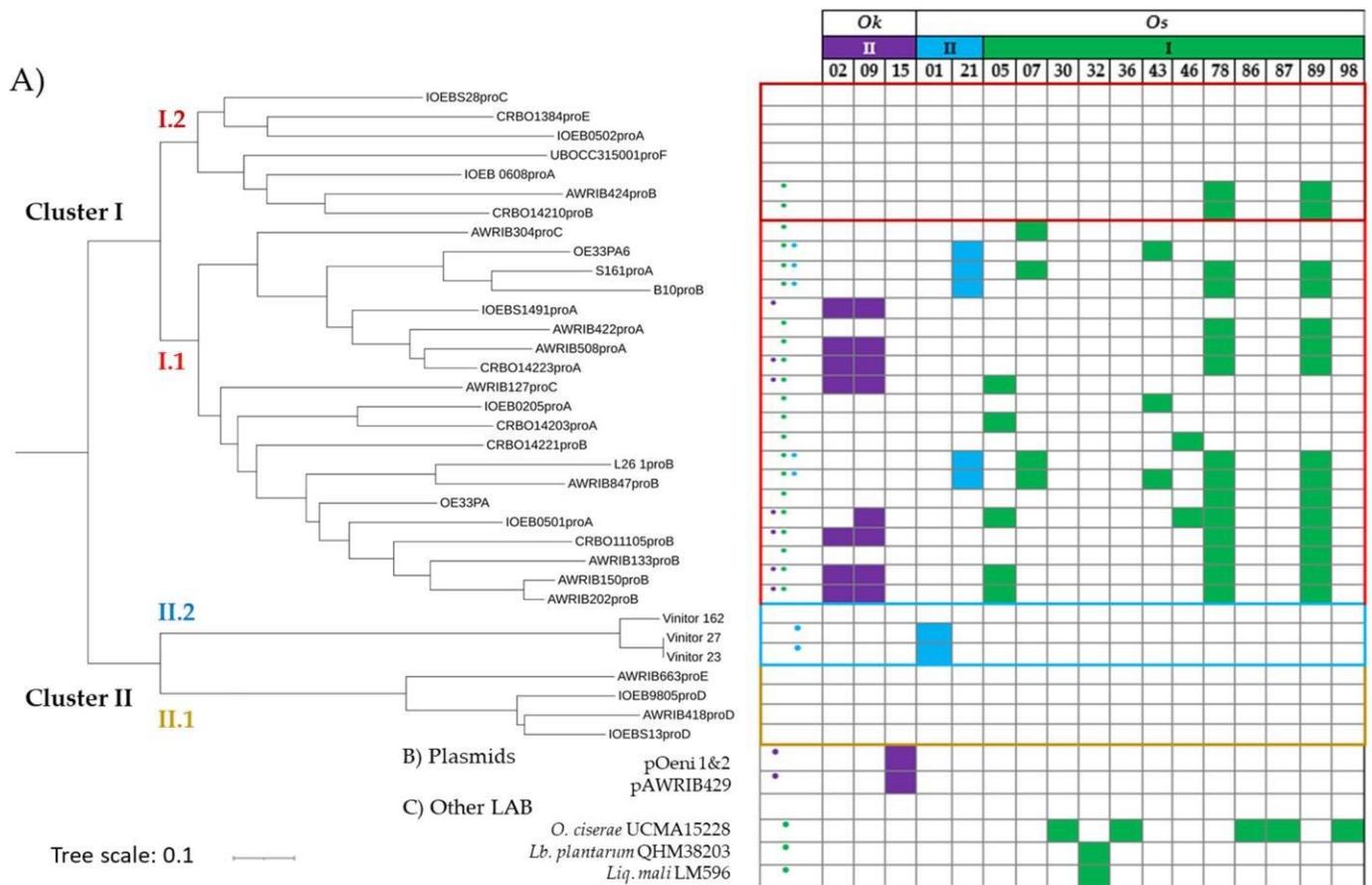


Figure 3. Distribution of the protospacers in oenophages. **(A)** Phylogenetic tree of the 34 phages of *O. oeni*, including OE333PA (ex-temperate), OE33PA6 (temperate) and Vinitor (strictly lytic), which were isolated as free replicating phage particles from must or wine samples. Other genomes correspond to prophages, and reference to their cognate integrase group was also added, since many lysogens harbour two or three prophages belonging to distinct integrase groups. In the leftward column, dots were used to summarize the presence of protospacers targeted by the CRISPR of *O. kitaharae* (purple) or *O. sicerae* (blue and/or green); **(B)** presence of spacers in plasmids of *O. oeni*; **(C)** presence of spacers in the genome of other LAB. *Lb. plantarum*, *Lactiplantibacillus plantarum*; *Liq. mali*, *Liquorilactobacillus mali*.

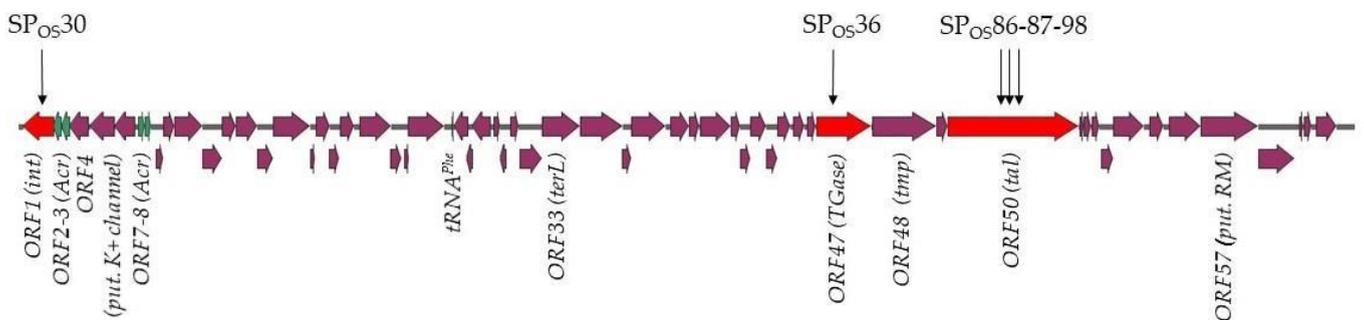


Figure 4. Auto-immunity and location of STS in *O. sicerae* UCMA15228. The genomic organization of the prophage genome targeted by the type I CRISPR system is shown. The location of the protospacers incorporated into the CRISPR locus as STS (SP_{Os}30, SP_{Os}36, SP_{Os}86, SP_{Os}87 and SP_{Os}98) are indicated above the map. The four putative *acr* genes are in green. Tgase: Transglycosylase.

The presence of STS in *O. sicerae* is consistent with recent data showing that prophages are associated with extensive CRISPR-Cas autoimmunity [62–64]. A model was recently proposed where primed adaptation in type I systems amplifies STS by acquisition of new spacers from both prophage and prophage-adjacent regions [62]. Yet, targeting of the prophage region did not lead to STS of endogenous flanking genomic regions in *O. sicerae*. As seen in Figure 4, the prophage genes targeted by CRISPR in *O. sicerae* included genes encoding the integrase (ORF1), a putative transglycosylase soluble domain-containing protein that may be a minor tail component (ORF47), and the tail associated lysin (Tal) baseplate protein (ORF50) (Figure 4). The later gene was targeted by three distinct STS, which were part of the oldest spacers in the CRISPR array, suggesting these were the initial hits.

As part of the ongoing bacterial-phage arms race, escape from the lethal outcome of auto-immunity occurs through various mechanisms in bacteria, including the acquisition of mutations on the target sequence and/or inactivation of CRISPR–Cas functionality via, for example, mutation or deletion of essential sequences in the array [62–64]. Yet, we predicted the 5'-TTA-3' sequence as the conserved protospacer adjacent motif (PAM) upstream of the five STS (as well as in three of the five protospacers in oenophages). We therefore investigated the presence of anti-CRISPR (Acr) proteins, which also play a major role in auto-immunity evasion and in the co-evolution of phages and their bacterial hosts [65]. We performed bioinformatic searches for Acr orthologs in the prophage of *O. sicerae* UCMA15228 using the online database AcrDB [47] and retrieved four candidate proteins with high confidence. They are encoded by ORF2, ORF3, ORF7 and ORF8 (Figure 4). Products of ORF1 and ORF7 were assigned to AcrIIA1 and AcrIF11, respectively. Acr candidates did not have neighbouring Aca homologs. It was recently observed that only a small percentage (23% in bacteria and 8.2% in viruses) of Acr and Aca form operons and are difficult to predict due to their genomic and structural diversity [66].

3.5. Protospacer-Containing Prophages and Genes in *O. oeni*

Since host CRISPRs in *O. kitaharae* and *O. sicerae* bear evidence of a few encounters with oenophages, we next investigated how the protospacers matching the ten identified spacers (SP_{OKII2}, SP_{OKII9}, SP_{OSII1}, SP_{OSII21}, SP_{OSI5}, SP_{OSI7}, SP_{OSI43}, SP_{OSI46}, SP_{OSI78} and SP_{OSI89}) were distributed in our representative set of 34 phages of *O. oeni*. To better capture the diversity among oenophages, a phylogenetic tree using the full genome of the selected phages was constructed, and all results are provided in Figure 3.

Approximately 65% (22/34) of the representative oenophages contained at least one protospacer matching a bacterial spacer sequence in *O. kitaharae* or *O. sicerae* (Figure 3). Matches were distributed across the two main phylogenetic clusters, earlier described as I and II [19].

Comparing the spacers to known oenophages also revealed differential targeting of related viral groups by CRISPRs, with possible distributed immunity to some phylogenetically related oenophages belonging to subcluster I.1 (Figure 3). Of note, the targeted oenophages from cluster I.1 were recently shown to dominate the viral population upon completion of the MLF in red wines [30]. In contrast, phages affiliated with subclusters I.2 and II.2 (strictly lytic Vinitor phages) [22] had noticeably fewer protospacers, while phages in cluster II.1 contained no protospacers. The latter cluster includes the Int_D temperate phages, which were recently assigned to the new genus *Sozzivivirus* [23]. Such phages may have a more restricted niche and less probability to interact with *O. sicerae* and *O. kitaharae*. This hypothesis needs further investigation.

Most spacers could match more than one virus in cluster I.1. We observed that prophages AWRIB847_{ProB}, AWRIB202_{ProB}, AWRIB150_{ProB} and IOEB0501_{ProA} had the most protospacers (five), followed by AWRIB508_{ProA}, CRBO14223_{ProA}, S161_{ProA}, L26.1_{ProB}, CRBO11105_{ProB} (four), IOEBB10_{ProB} and AWRIB127_{ProC} (three) (Figure 3). Three of these prophages, namely IOEB0501_{ProA}, S161_{ProA} and L26.1_{ProB}, were previously shown to be

released as free particles upon mitomycin induction of their lysogenic hosts and to form plaques on various strains of *O. oeni* [19].

We next analysed the targeted-gene characteristics in oenophages, and some spacers shared a region of homology with the genes encoding tail components (TMP, Dit, Tal), capsid protein (head closure knob protein) and DNA packaging machinery (portal protein), which play vital roles in the phage life cycle (Table 2). It is worth noting that the protospacer-containing gene *tmp2* in S161_{ProA} was used in our initial phage-typing scheme.

We also observed that the *dit* gene was targeted twice by the type II system from *O. kitaharae*. Similarly, three spacers from the *O. sicerae* type I-E system (SP_{OSI}43, SP_{OSI}78, SP_{OSI}89) matched gene regions encoding hypothetical proteins that were located in the predicted replication module of the phage genomes (Table 2). The immunity offered by this type of CRISPR-Cas system could therefore prevent phage replication via the destruction of these critical components and enhance the viability of bacteria in phage-rich environments. The protospacers incorporated into the *O. sicerae* type I CRISPR locus as SP_{OSI}78 and SP_{OSI}89 were of particular interest due to their high frequency among phages from cluster I (15 of 27 phages). The sequences were both located in a gene specifying a conserved putative bi-functional primase-polymerase (97–100% identity at the protein level among the 15 phages) (Table 2, Figure 3). Orthologous protein sequences are also found in other phages such as the dairy phages PLE2 (51% identity, YP_009282384) and 98201 (46% identity, YP_009286328) infecting *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*, respectively. This ORF was lacking among the 12 remaining oenophages from cluster I (Figure 3). Several variants of the two protospacers were found, and sequence alignments of SPOSI78, SPOSI89 and the corresponding protospacers amongst oenophages are given in Figure 5A. Yet, mutations were not specific to the targeted portions of the gene and accounted for a total of 20 positions, which were distributed along the ORF. We propose that both protospacers incorporated as SP_{OSI}78 and SP_{OSI}89 are ancestral and may represent a common origin for phages of *O. oeni* and *O. sicerae*. This may reflect exposure to a virus from the same viral family that has undergone sequence divergence over evolutionary times.

More recent spacers were also found and may arise from contemporary phages that may be present in the different habitats of the congeneric oenococcal species. In particular, SP_{OSII}1 was incorporated as a spacer from both strictly lytic phages Vinitor 27 and Vinitor 23, but not Vinitor 162. The phage gene that was targeted in Vinitor 23 corresponded to the phage replisome organizer (Rep5). Analysis of the Rep5 protein sequences from Vinitor 23 and its homologue in Vinitor 162 is given in Figure 5B,C and reflects various genome rearrangements. One of them in Vinitor162 eliminated the protospacer matching with SP_{OSII}1. Future work is now needed (i) to assess whether such variations are a response of phages to escape CRISPR pressure and (ii) to isolate additional strictly lytic phages of *O. oeni* and *O. sicerae*.

3.6. Search for Cross-Infections in the *Oenococcus* Genus

The presence of a few recent spacers in the CRISPR loci of strains of *O. sicerae* and *O. kitaharae* with homology to predicted oenophage genomes is suggesting that some phages may not be strictly species-specific and may infect a broader range of strains in the *Oenococcus* genus. Although phage selection is generally considered to be narrow for the host, increasing evidence suggests that phages have a broad host range in nature, such as recently shown for *Staphylococcus* phages [67]. Furthermore, CRISPR spacers are now powerful datasets used to predict bacterial hosts of MGE [25]. We thus sought to assess the host-range of reference oenophages and performed preliminary interactions studies using the double-agar assay between phages and oenococcal hosts from different species and beverages (Table 3).

The two latter strains have a single prophage as assessed by PCR and MC-induction assays. Both phage lysates were obtained upon MC-induction of cultures grown in MRS broth. Vinitor 162 was the representative of cluster II (cluster II.2). We also tested the Krappator 27 phage. No integrase was amplified by PCR, suggesting that this phage is strictly lytic. In addition, PCR assays targeting the Vinitor-associated sequences in *rep5*, *ters7* and *tmp6* were also negative, suggesting that Krappator 27 may represent a new phage group amongst oenophages. Last, MC-induced cultures of *O. sicerae* UCMA15228 and *O. alcoholitolerans* JP736 were also tested. For the latter strain, analysis of phage DNA from a MC-induced culture suggested the presence of a single prophage (Figure S2).

The seven phage lysates were tested against eight strains belonging to the *O. oeni*, *O. sicerae*, *O. kitaharae* and *O. alcoholitolerans* species, which were collected from distinct beverages. Four phages infecting *O. oeni* (OE33PA, Krappator 27, Vinitor 162 and the Int_E phage from strain CRBO1384) formed plaques on at least one host. Yet, their host-ranges did not extend beyond the *O. oeni* species. Interestingly, although we could not observe any cross species viral infections, positive infection assays were detected across beverage (wine, cider and kombucha) in the *O. oeni* species.

4. Conclusive Remarks

The application of next generation sequencing to comparative genomics has enabled in-depth characterization of genetic variation between strains of *Oenococcus oeni* obtained from wine, apple cider and kombucha. Regarding the strategy used to fight invaders, all strains lack a CRISPR mechanism, regardless of the beverage and fruits from which they originated. In contrast, our data suggest that CRISPR-Cas systems are present in *O. sicerae*, *O. kitaharae* and *O. alcoholitolerans*, even though we currently ignore the extent to which such systems are operational in the three sister species, warranting further analyses. Of the two genomes available in each of the *O. sicerae* and *O. kitaharae* species, only one contains a CRISPR-locus, suggesting that the presence of CRISPR-Cas systems may be strain- rather than species-dependent. The ecological factors that drive variation in CRISPR-Cas prevalence across natural microbial communities associated with beverages remain unclear. Our preliminary data obtained in *O. alcoholitolerans* are invaluable as a baseline study of whether plasmids may facilitate their dissemination and how ecosystems could favour loss of CRISPR systems in certain conditions in the *Oenococcus* genus. The interplay and redundancy between different phage defence systems may also contribute to CRISPR-Cas distributions in different environments and should be investigated as more genomes become available in sister species.

CRISPR-Cas spacers represent a sequential quelling of former intruder encounters, and the retained spacers reflect evolutionary phylogeny or relatedness of the strains. In the present study, we observed that the CRISPR-Cas system in *O. sicerae* and *O. kitaharae* showed spacer matching with *O. oeni* phages and plasmids. This may indicate that members of these bacterial species have acquired immunity against related phages in their specific environments. Yet, with the performed phage–host range experiments, we could not observe any cross-species infection between phages and strains. The only positive results were obtained within the *O. oeni* species. Experimental efforts are needed to isolate more strains, as this will help assessing whether phage adsorption on host cell surface relies on specific features in *O. oeni* as compared to the three sister species.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15010015/s1>, Figure S1: Phylogenetic trees of the type II and type I signature proteins Cas9 and Cas3; Figure S2: MC-induction of *O. alcoholitolerans* JP736; Table S1: Phage, bacterial genomes and plasmid sequences used in the study; Table S2: list of primers used in our study; Table S3: list of spacers in the four CRISPR loci identified in the *Oenococcus* genus; Table S4: rapid sub-typing scheme amongst oenophages showing 27 distinct patterns.

Author Contributions: Conceptualization, O.C. and C.L.M.; methodology, O.C., C.P. and C.L.M.; software, C.L.M. and O.C.; formal analysis, Y.B., O.C. and C.L.M.; investigation, Y.B., F.O.-H. and

A.C.; writing—original draft preparation, C.P., Y.B., O.C. and C.L.M.; writing—review and editing, C.L.M.; funding acquisition, C.L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Support for this project was provided by the French ANR (grant ANR-20CE20-0008-01).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data used in this study is available from the Genbank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed on 6 October 2022)).

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

References

1. International Organisation of Vine and Wine [OIV]. *Annual Report*; International Organisation of Vine and Wine: Paris, France, 2021.
2. Vitulo, N.; Lemos, W.J.F., Jr.; Calgaro, M.; Confalone, M.; Felis, G.E.; Zapparoli, G.; Nardi, T. Bark and grape microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of geographic patterns and agronomic management on bacterial diversity. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fournier, P.; Pellan, L.; Barroso-Bergad, D.; Bohanc, D.A.; Candresse, T.; Delmotte, F.; Dufour, M.-C.; Lauvergeat, V.; Le Marrec, C.; Marais, A.; et al. The functional microbiome of grapevine throughout plant evolutionary history and lifetime. *Adv. Ecol. Res.* **2022**, *in press*.
4. Lorentzen, M.P.G.; Lucas, P.M. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 2937–2945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sánchez, A.; Coton, M.; Coton, E.; Herrero, M.; García, L.A.; Díaz, M. Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 32–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lorentzen, M.P.; Campbell-Sills, H.; Jorgensen, T.S.; Nielsen, T.; Coton, M.; Coton, E.; Hansen, L.; Lucas, P.M. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Suhre, T.; Mann, M.B.; Kothe, C.I.; Rocha, A.L.G.; Celso, P.G.; Varela, A.P.M.; Frazzon, A.P.G.; Frazzon, J. Microbial community and physicochemical characterization of kombuchas produced and marketed in Brazil. *J. Food Sci. Nutr. Res.* **2021**, *4*, 302–316.
8. Leech, J.; Cabrera-Rubio, R.; Walsh, A.M.; Macori, G.; Walsh, C.J.; Barton, W.; Finnegan, L.; Crispie, F.; O’Sullivan, O.; Claesson, M.J.; et al. Fermented-Food Metagenomics Reveals Substrate-Associated Differences in Taxonomy and Health-Associated and Antibiotic Resistance Determinants. *mSystems* **2020**, *5*, e00522-20. [[CrossRef](#)]
9. Varakumar, S.; Naresh, K.; Variyar, P.S.; Sharma, A.; Reddy, O.V.S. Role of Malolactic Fermentation on the Quality of Mango (*Mangifera indica* L.) Wine. *Food Biotechnol.* **2013**, *27*, 119–136. [[CrossRef](#)]
10. Pothakos, V.; De Vuyst, L.; Zhang, S.J.; De Bruyn, F.; Verce, M.; Torres, J.; Callanan, M.; Moccand, C.; Weckx, S. Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria. *Curr. Res. Biotechnol.* **2020**, *2*, 1–15. [[CrossRef](#)]
11. Mattila, H.R.; Rios, D.; Walker-Sperling, V.E.; Roeselers, G.; Newton, I.L.G. Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32962. [[CrossRef](#)]
12. Dicks, L.; Endo, A. Are fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) beneficial to humans? *Benef. Microbes* **2022**, *13*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Badotti, F.; Moreira, A.P.; Tonon, L.A.; de Lucena, B.T.; Gomes Fde, C.; Kruger, R.; Thompson, C.C.; de Moraes, M.A., Jr.; Rosa, C.A.; Thompson, F.L. *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2004**, *106*, 1259–1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Endo, A.; Okada, S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 2345–2348. [[CrossRef](#)]
15. Cousin, F.J.; Le Guellec, R.; Chagnot, C.; Goux, D.; Dalmasso, M.; Laplace, J.-M.; Cretenet, M. *Oenococcus sicerae* sp. nov., isolated from French cider. *Syst. Appl. Microbiol.* **2019**, *42*, 302–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Verce, M.; De Vuyst, L.; Weckx, S. The metagenome-assembled genome of Candidatus *Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol.* **2020**, *88*, 103402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Koskella, B.; Brockhurst, M.A. Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 916–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Jaamanjaka, F.; Ballestra, P.; Dols-Lafargue, M.; Le Marrec, C. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: Insights into a novel group based on the integrase sequence. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *166*, 331–340. [[CrossRef](#)]
19. Claisse, O.; Chaib, A.; Jaamanjaka, F.; Philippe, C.; Barchi, Y.; Lucas, P.M.; Le Marrec, C. Distribution of Prophages in the *Oenococcus oeni* Species. *Microorganisms* **2021**, *9*, 856. [[CrossRef](#)]

20. Jaomanjaka, F.; Philippe, C.; Claisse, O.; Le Marrec, C. Complete Genome Sequence of Lytic *Oenococcus oeni* Bacteriophage OE33PA. *Microbiol. Resour. Announc.* **2018**, *7*, e00818–18. [[CrossRef](#)]
21. Philippe, C.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Laforgue, R.; Maupeu, J.; Petrel, M.; Le Marrec, C. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *257*, 138–147. [[CrossRef](#)]
22. Philippe, C.; Chaïb, A.; Jaomanjaka, F.; Claisse, O.; Lucas, P.M.; Samot, O.J.; Cambillau, C.; Le Marrec, C. Characterization of the First Virulent Phage Infecting *Oenococcus oeni*, the Queen of the Cellars. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 103389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Walker, P.J.; Siddell, S.G.; Lefkowitz, E.J.; Mushegian, A.R.; Adriaenssens, E.M.; Alfenas-Zerbini, P.; Davison, A.J.; Dempsey, D.M.; Dutilh, B.E.; García, M.L.; et al. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **2021**, *166*, 2633–2648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chaïb, A.; Philippe, C.; Jaomanjaka, F.; Barchi, Y.; Oviedo-Hernandez, F.; Claisse, O.; Le Marrec, C. Phage-host interactions as a driver of population dynamics during wine fermentation: Betting on underdogs. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *383*, 109936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **2007**, *315*, 1709–1712. [[CrossRef](#)]
26. Virdis, C.; Sumbly, K.; Bartowsky, E.; Jiranek, V. Lactic Acid Bacteria in Wine: Technological Advances and Evaluation of Their Functional Role. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 612118. [[CrossRef](#)]
27. Philippe, C.; Moineau, S. The endless battle between phages and CRISPR–Cas systems in *Streptococcus thermophilus*. *Biochem. Cell Biol.* **2021**, *99*, 397–402. [[CrossRef](#)]
28. Westra, E.R.; Van Houte, S.; Gandon, S.; Whitaker, R. The ecology and evolution of microbial CRISPR–Cas adaptive immune systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2019**, *374*, 20190101. [[CrossRef](#)]
29. Marcobal, A.M.; Sela, D.A.; Wolf, Y.I.; Makarova, K.S.; Mills, D.A. Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 564–570. [[CrossRef](#)]
30. Sorek, R.; Kunin, V.; Hugenholtz, P. CRISPR—A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 181–186. [[CrossRef](#)]
31. Chevallereau, A.; Meaden, S.; van Houte, S.; Westra, E.R.; Rollie, C. The effect of bacterial mutation rate on the evolution of CRISPR–Cas adaptive immunity. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2019**, *374*, 20180094. [[CrossRef](#)]
32. Borneman, A.R.; McCarthy, J.M.; Chambers, P.J.; Bartowsky, E.J. Functional Divergence in the Genus *Oenococcus* as Predicted by Genome Sequencing of the Newly-Described Species, *Oenococcus kitaharae*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dion, M.B.; Plante, P.-L.; Zufferey, E.; Shah, S.A.; Corbeil, J.; Moineau, S. Streamlining CRISPR spacer-based bacterial host predictions to decipher the viral dark matter. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3127–3138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Crawley, A.B.; Henriksen, E.D.; Stout, E.; Brandt, K.; Barrangou, R. Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR–Cas systems in lactobacilli. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Barchi, Y.; Chaïb, A.; Philippe, C.; Claisse, O.; Le Marrec, C. Draft genome sequence of *Oenococcus kitaharae* CRBO2176, isolated from a home-made water kefir. *Genome Announc.* **2022**, submitted.
36. Chaïb, A.; Claisse, O.; Delbarre, E.; Bosviel, J.; Le Marrec, C. Assessment of the lysogenic status in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* during the spontaneous malolactic fermentation of red wines. *Food Microbiol.* **2022**, *103*, 103947. [[CrossRef](#)]
37. Glonti, T.; Pirnay, J.-P. In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses* **2022**, *14*, 1490. [[CrossRef](#)]
38. Chaïb, A.; Decossas, M.; Philippe, C.; Claisse, O.; Lambert, O.; Marrec, C.L. Isolation and CryoTEM of Phages Infecting Bacterial Wine Spoilers. *BIO-Protocol* **2020**, *10*, e3801. [[CrossRef](#)]
39. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Mol. Cell Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)]
40. McNair, K.; Aziz, R.K.; Pusch, G.D.; Overbeek, R.; Dutilh, B.E.; Edwards, R. Phage Genome Annotation Using the RAST Pipeline. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1681*, 231–238.
41. Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W244–W248. [[CrossRef](#)]
42. Meier-Kolthoff, J.P.; Auch, A.F.; Klenk, H.-P.; Göker, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Meier-Kolthoff, J.P.; Göker, M. VICTOR: Genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3396–3404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Couvin, D.; Bernheim, A.; Toffano-Nioche, C.; Touchon, M.; Michalik, J.; Néron, B.; Rocha, E.; Vergnaud, G.; Gautheret, D.; Pourcel, C. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRfinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W246–W251. [[CrossRef](#)]
46. Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)]

47. Huang, L.; Yang, B.; Yi, H.; Asif, A.; Wang, J.; Lithgow, T.; Zhang, H.; Minhas, F.A.; Yin, Y. AcrDB: A database of anti-CRISPR operons in prokaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *49*, D622–D629. [[CrossRef](#)]
48. Hidalgo-Cantabrana, C.; Goh, Y.J.; Pan, M.; Sanozky-Dawes, R.; Barrangou, R. Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 15774–15783. [[CrossRef](#)]
49. Börner, R.A.; Kandasamy, V.; Axelsen, A.M.; Nielsen, A.T.; Bosma, E.F. Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**, *366*, fny291. [[CrossRef](#)]
50. Hidalgo-Cantabrana, C.; Crawley, A.B.; Sanchez, B.; Barrangou, R. Characterization and Exploitation of CRISPR Loci in *Bifidobacterium longum*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1851. [[CrossRef](#)]
51. Lee, S.H.; Jung, J.Y.; Lee, S.H.; Jeon, C.O. Complete genome sequence of *Leuconostoc kimchii* strain C2, isolated from Kimchi. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 5548. [[CrossRef](#)]
52. McDonald, N.D.; Regmi, A.; Morreale, D.P.; Borowski, J.D.; Boyd, E.F. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Garrett, S.C. Pruning and Tending Immune Memories: Spacer Dynamics in the CRISPR Array. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 664299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Martynov, A.; Severinov, K.; Ispolatov, I. Optimal number of spacers in CRISPR arrays. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Misery, B.; Legendre, P.; Rue, O.; Bouchart, V.; Guichard, H.; Laplace, J.M.; Cretenet, M. Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. *Int. J. Food Microbiol.* **2021**, *339*, 108987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Bernay, B.; Goux, D.; Monnet, C.; Dalmaso, M. Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages. *Food Microbiol.* **2022**, *107*, 104069. [[CrossRef](#)]
57. Ledormand, P.; Desmasures, N.; Midoux, C.; Rué, O.; Dalmaso, M. Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1203. [[CrossRef](#)]
58. Favier, M.; Bihère, E.; Lonvaud, A.; Moine, V.; Lucas, P.M. Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49082. [[CrossRef](#)]
59. Mesas, J.M.; Rodríguez, M.C.; Alegre, M.T. Nucleotide Sequence Analysis of pRS2 and pRS3, Two Small Cryptic Plasmids from *Oenococcus oeni*. *Plasmid* **2001**, *46*, 149–151. [[CrossRef](#)]
60. Costello, P.J.; Kolouchova, R.; Jordans, C.; McCarthy, J.; Schmidt, S.A. Analysis of Transcriptomic Response to SO₂ by *Oenococcus oeni* Growing in Continuous Culture. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e0115421.
61. Tisza, M.J.; Buck, C.B. A catalog of tens of thousands of viruses from human metagenomes reveals hidden associations with chronic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2023202118. [[CrossRef](#)]
62. Nobrega, F.L.; Walinga, H.; Dutilh, B.E.; Brouns, S. Prophages are associated with extensive CRISPR–Cas auto-immunity. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 12074–12084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Watson, B.N.J.; Easingwood, R.A.; Tong, B.; Wolf, M.; Salmond, G.P.C.; Staals, R.H.J.; Bostina, M.; Fineran, P.C. Different genetic and morphological outcomes for phages targeted by single or multiple CRISPR-Cas spacers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2019**, *374*, 20180090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nicholson, T.J.; Jackson, S.A.; Croft, B.I.; Staals, R.H.J.; Fineran, P.C.; Brown, C.M. Bioinformatic evidence of widespread priming in Type I and II CRISPR-Cas systems. *RNA Biol.* **2018**, *18*, 1–11.
65. Bondy-Denomy, J.; Pawluk, A.; Maxwell, K.L.; Davidson, A.R. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* **2013**, *493*, 429–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yin, Y.; Yang, B.; Entwistle, S. Bioinformatics Identification of Anti-CRISPR Loci by Using Homology, Guilt-by-Association, and CRISPR Self-Targeting Spacer Approaches. *mSystems* **2019**, *4*, e00455-19. [[CrossRef](#)]
67. Göller, P.C.; Elsener, T.; Lorgé, D.; Radulovic, N.; Bernardi, V.; Naumann, A.; Amri, N.; Khatchatourova, E.; Hernandes Coutinho, F.; Loessner, M.J.; et al. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6965. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Chapitre III

Caractérisation des oenophages du genre

Krappator

Avant-propos

L'essentiel des travaux antérieurs menés au laboratoire s'est focalisé sur les oenophages, c'est-à-dire les phages infectant *O. oeni*. Ces études ont mis en évidence la biodiversité des oenophages tempérés et montré leur appartenance à deux groupes génétiques distincts. Le cluster I rassemble les phages les plus représentés dans l'écosystème, qui sont associés aux groupes Int_{A-B-C-F} alors que les phages Int_D sont associés au cluster II. Les prophages du groupe Int_E sont plus rares dans la population. Selon leur association avec des souches de cidre ou de vin, ils sont affiliés aux clusters I et II, respectivement.

La recherche de phages strictement lytiques dans l'écosystème œnologique a été plus complexe, et la démonstration de leur existence bien plus tardive. Elle a exigé une approche globale qui s'est appuyée sur la collecte de plus de 160 échantillons, à tous les stades de la vinification et dans différents types de vins. Elle doit également son succès à la mise en place d'un dispositif permettant l'analyse rapide des échantillons après collecte. L'approche a conduit à la caractérisation des phages du groupe Vinator (Philippe *et al.*, 2017, 2021). Ce groupe présente une phylogénie distincte de celle de la majorité des oenophages tempérés et ses membres se retrouvent dans le cluster II. Ils ont une origine commune avec des phages de bactéries lactiques (BL) associées au tractus gastro-intestinal d'insectes, comme les prophages de l'espèce *Convivina spp* (Philippe *et al.*, 2021). Ces observations suggèrent que la surface des baies de raisin et/ou le tractus des insectes pourrai(en)t abriter une communauté de phages, offrant un réservoir de séquences et un écosystème propice à la recombinaison résultant en l'émergence de nouveaux génomes mosaïques de phages actifs sur l'espèce *O. oeni*.

Les mêmes travaux (Philippe *et al.*, 2017) ont suggéré l'existence d'un second groupe d'oenophages nommés Krappator, capables de former des plages claires sur la souche sensible IOEBS277. L'originalité de ces phages a été précisée par analyse de leur génome par PCR, ce qui a montré l'absence de séquences communes avec les oenophages tempérés et ceux du groupe Vinator. Dans ce chapitre, notre objectif a été de poursuivre la caractérisation de ces phages d'un point de vue de leur physiologie, de leur morphologie et de leur génome. Il est notamment intéressant d'intégrer les données génomiques obtenues avec celles issues des autres phages infectant les espèces *O. oeni* et *O. sicerae* étudiées dans le chapitre précédent. La caractérisation plus aboutie des phages Krappator ouvre également la

perspective d'établir une classification des oenophages en espèces et genres, à l'instar des travaux récents menés chez d'autres BL et de mieux comprendre les relations évolutives entre ces entités. Les connaissances sur la biodiversité des phages infectant les espèces *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lb. brevis* ou encore *Lb. plantarum* se sont particulièrement enrichies durant ces dernières années. Les phages infectant les membres de ces espèces se répartissent en plusieurs groupes génétiques, et certains sont aujourd'hui affiliés à des genres : *Moineavirus* et *Brüssowvirus* pour deux des cinq groupes de phages de *S. thermophilus*, anciennement dits « *cos* » et « *pac* » (Le Marrec *et al.*, 1997 ; Lavelle *et al.*, 2022), *Silenusvirus*, *Semelevirus* et *Lenuvirus* pour trois groupes de phages de *Lb. plantarum* (Kyrkou *et al.*, 2019 ; 2020) ou encore *Skunaviruses* et *Ceduoviruses* (anciennement groupes 936 et c2, respectivement) pour les phages de lactocoques (Walker *et al.*, 2021).

Enfin, la caractérisation des phages Krappator a eu pour dernier objectif de préciser les modalités d'adsorption des particules virales sur la paroi de la bactérie hôte. Cet objectif fait partie intégrante du projet ANR intitulé WINE. Notre équipe bénéficie des compétences du laboratoire LISM de Marseille (Equipe « Host-Phage Interactions », animée par le Dr Adeline Goulet) sur la biologie structurale des anti-récepteurs phagiques et ceux de l'équipe « Dynamique de la paroi bactérienne » animée par le Dr Marie-Pierre Chapot-Chartier, qui s'intéresse aux récepteurs pariétaux des phages de BL.

L'article présenté dans ce chapitre sera prochainement soumis à *Applied and Environmental Microbiology*. Il rassemble les expériences de physiologie et de génomique comparative réalisées au laboratoire sur deux phages du genre Krappator. L'analyse AlfaFold2 menée par Adeline Goulet a permis de prédire la topologie de la queue des phages Krappator27 et 149. Ces éléments apportent des éléments sur la nature du récepteur pariétal reconnu dans l'enveloppe de *O. oeni*. En complément de ce travail, j'ai isolé chez la souche sensible *O. oeni* BL4 un mutant résistant au phage X₂₇ et son génome a été séquencé. L'analyse comparative du génome de la souche sauvage (sensible) et du mutant (résistant) permet de proposer des pistes quant à la structure possible du récepteur du phage.

Expanding the repertoire of lytic phages infecting the wine lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* with the proposal of a new genus ‘Krappator’

Yasma BARCHI^a, Florencia OVIEDO-HERNANDEZ^a, Amel CHAÏB^a, Cécile PHILIPPE^a, Olivier CLAISSE^a, Christian CAMBILLAU^b, Adeline GOULET^c and Claire LE MARREC^{a*}

^aUniv. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, UMR1366 Œnologie, F-33140, Villenave d'Ornon, France

^bAlphaGraphix, Formiguères, 66210, France

^cLaboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires – CNRS UMR7255, 31 Chemin Joseph Aiguier 13402 Marseille cedex 20, France

* Correspondence: Claire Le Marrec (clehenaff@enscbp.fr)

ABSTRACT Here we report the discovery of two new strictly lytic phage species X₂₇ and X₁₄₉ that target industrially relevant strains of *O. oeni*. Both viruses share morphological features and genomic organization with known phages infecting *O. oeni* and other lactic acid bacteria. However, based on the limited nucleotide similarity with members of the class *Caudoviricetes*, we propose that they constitute a novel genus called Krappator. Genomic comparisons provide evidence of genetic transfer between these virulent phages and temperate phages of *O. oeni* and *O. sicerae*, which may have been facilitated by the presence of a recombinase in the Krappator phage genomes. This finding may also have implications in the observed sequence divergence in the N-terminal moiety of three crucial proteins of known function (the small Terminase subunit, the endolysin and a replication-associated protein) between the X₂₇ and X₁₄₉ phage genomes. Last, structure prediction of the whole host adhesion devices of Krappator phages using AlphaFold2 (AF2) reveals an elongated multi-domain machinery containing carbohydrate-binding modules likely involved in host recognition and binding. Yet, slight variations on the Tail structures are observed between X₂₇ and X₁₄₉ and may be related to differences in host spectra.

IMPORTANCE The present work expands upon our understanding on the classification, phylogeny, and genomic organization of a new and substantial phage group that prey on industrially relevant *Oenococcus* species. Upon their relevance for bacterial community assembly and functioning during wine-making, our data also high light the great biodiversity of oenophages and the importance of homologous recombination to expand the gene repertoires available for phage and bacterial evolution.

KEYWORDS

Lytic phage; *Oenococcus*; Winemaking; Malolactic fermentation; AlphaFold2; host adhesion device.

INTRODUCTION

Wines are among the most iconic fermented products worldwide. The conversion of grapejuice to wine relies on yeasts and lactic acid bacteria (LAB) that conduct the alcoholic fermentation (AF) and the malolactic fermentation (MLF), respectively (1,2). The ecology of wine fermentations at the scale of wineries has first revealed a large diversity of microorganisms including various yeasts, bacteria and fungi. Further explorations have then expanded to the whole vineyard, which represents the initial environment affecting the microbial makeup of a wine fermentation. Acquisition of such data is essential to preserve and improve wine quality, anticipate climate change, and assist winemakers during the transition towards more sustainable practice, such as the reduction of sulfites and implementation of biocontrol strategies.

In recent years, multi-omic tools have become increasingly important to better understand the function and resilience of vine-wine ecosystems. High-throughput analyses have recently questioned on how geography, climate, soil properties, and winemaking practices may impact and shape microbial communities (3). Yet, a comprehensive understanding of the vine-wine ecosystem also requires the consideration of the virosphere. Viruses infecting bacteria, namely bacteriophages or phages, are widespread in must (crushed grapes) and wines where they infect spoiling bacteria, such as acetic acid bacteria (4), as well as the beneficial LAB *Oenococcus oeni* that drives MLF (5). An increasing amount of data on the diversity and abundance of *O. oeni*-infecting phages (oenophages) is becoming available. Over the last decade, remarkable progress in high-throughput sequencing has showed that 58% of *O. oeni*

strains, including commercial starters, harbor one or two prophages (6, 7). Recently, lysogens were also shown to dominate the *O. oeni* population upon completion of spontaneous MLF in red wines (5). The viral population associated with wine-making also consists of ex-temperate phages such as OE33PA, and also strictly lytic phages such as Vinator (6, 8, 9). The latter phages were particularly abundant in musts. During the early steps of wine-making, strictly lytic phages may participate to the selection of strains responsible for MLF and may also contribute to gene transfers in the ecosystem.

Comparative genomics of over 250 fully sequenced oenophages genomes shows that they can be divided into two groups of closely-related genomes referred to as clusters, which can be further divided into subclusters (6). The cluster I phages are exclusively temperate or ex-temperate while cluster II contains both temperate (Int_D group) and strictly lytic (Vinator) oenophages. Interestingly, Vinator 162 exhibits a unique evolutionary trajectory and its gene repertoire contains many sequences related to epiphytic and/or insect-associated LAB (8, 9, 10).

The aim of this study was to better characterize the diversity, global abundance, ecological and evolutionary impacts of strictly lytic oenophages during bacterial community assembly and functioning during wine-making. We show the morphological, biological, and genomic characterization of the X₂₇ and closely related X₁₄₉ phages, which represent a new genus within the *Caudovirales*, called Krappator. The phages have recombineering functions which may play a role in the evolution of its bacterial host. We further produced a structural model of Krappator's host adhesion device using the powerful machine-learning structure prediction software AlphaFold2 (AF2) (11, 12) which is to date the only method enabling structural analyses of large and flexible assemblies resistant to experimental approaches (10, 13). The Krappator's elongated and multi-domain host adhesion device differs from those of other LAB phages whose structure has been characterized. However, like for many other LAB phages, this device contains a combination of carbohydrate-binding modules likely functioning as receptor-binding domains.

RESULTS

X₂₇, a novel lytic phage from red wine. Phage X₂₇ was isolated from Merlot red wines during the 2015 vintage in France (8). It formed large and clear plaques against the *O. oeni* strain

IOEBS277, which were easily distinguishable from those produced by the strictly lytic Vinitor oenophages (9) (Fig. 1). In addition, expanded halo zones around plaques were observed following prolonged incubation of plates, which may indicate phage-mediated EPS-degradation of the cell envelope. The phage DNA could be digested with several restriction enzymes (BglIII, HindIII, EcoRI, NdeI) and the genome lacked the hallmark gene sequences related to the six integrases of temperate oenophages (6, 9), and the endolysin of Vinitor phages.

X₂₇ was easy to propagate. Following 72 h incubation, infections at MOI > 10⁻⁶ caused complete lysis in standard MRS_Φ broth at 25°C. The phage produced maximum titer for MOIs ranging from 2,5 x 10⁻⁴ to 10⁻³ (2 x 10¹⁰ PFU/mL) (Supplementary Fig. S1).

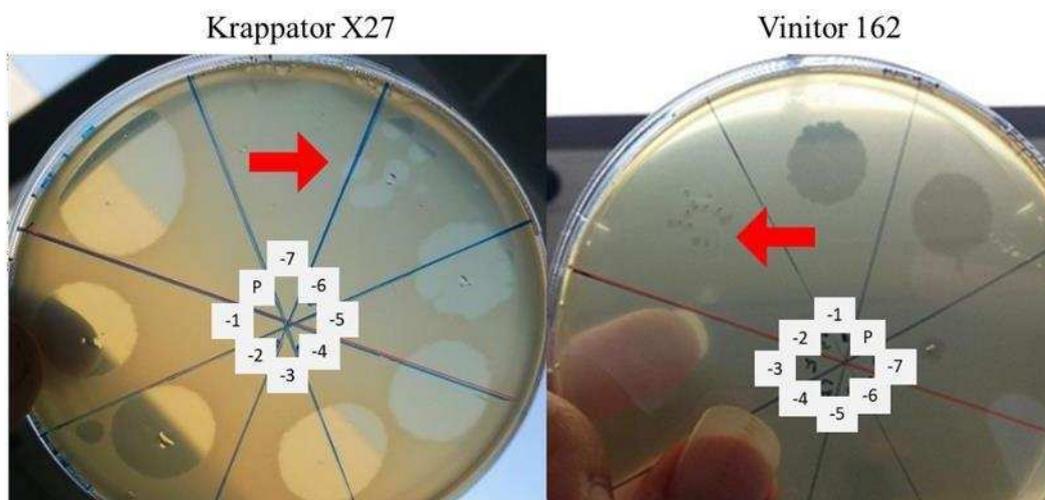


FIG 1 Titration of lysates of the X₂₇ and Vinitor₁₆₂ phages on *O. oeni* IOEBS277. Volumes of 8 μl of the pure (P) and serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁷) were spotted onto the top MRS_Φ agar. Red arrows represent individual plaques.

Host adsorption and one-step growth curve tests were performed in MRS broth. A 85% host adsorption efficiency was reached in 60 min at 25°C. The latent period was 3 hours, and newly-synthesized particles were totally released after an additional burst period of 2 hours. The burst size was 30 ± 5 PFU/cell (Supplementary Fig. S2).

Infection was also efficient in other liquid media supporting the growth of *O. oeni*, such as MLO and RGJ broths and also in MRS containing ribose, one of the major residual sugars in wine after completion of AF (Fig. 2 A and B). In contrast, infection was less efficient in Red Grape Juice (RGJ) liquid medium and was barely observed in White Grape Juice (WGJ) broth (Fig. 2 C and D).

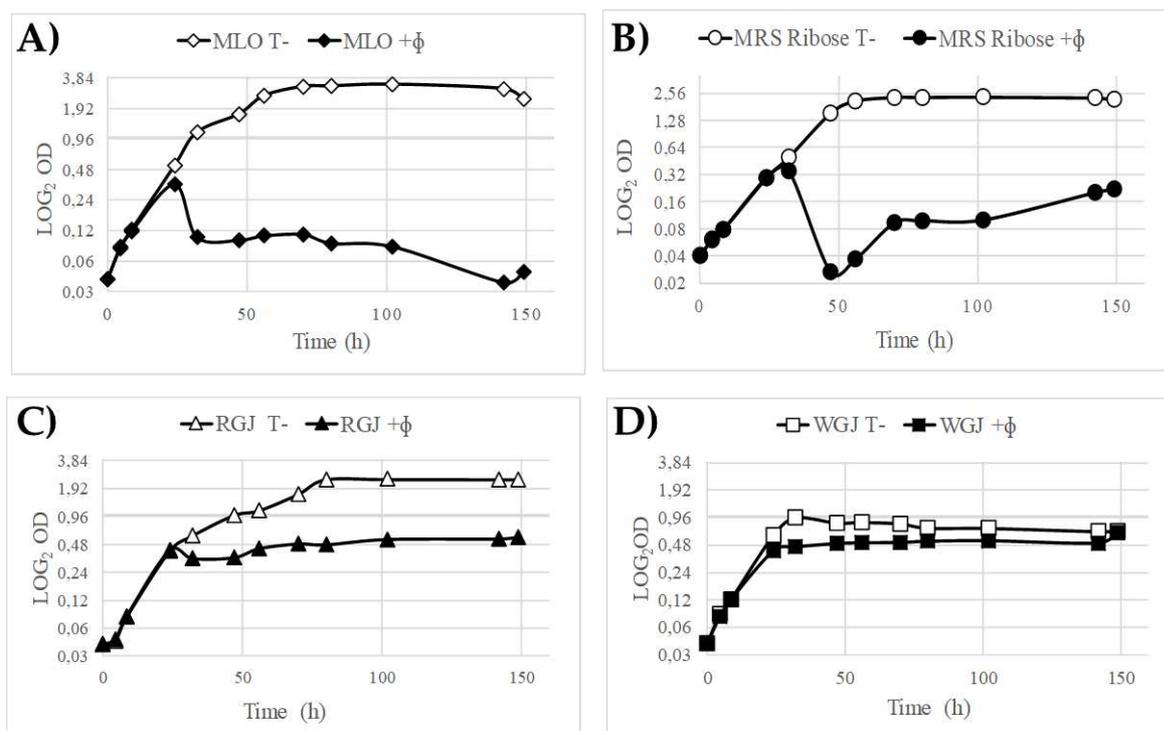


FIG 2 Impact of medium composition on the infection of strain IOEBS277 by X₂₇ at a moi of 0,003. Growth curves of the control and infected cultures in MLO (A), MRS Ribose (B), Red Grape Juice (RGJ) and White Grape Juice (WGJ).

To determine the host range of X₂₇, 17 representative *O. oeni* strains were chosen from the CRBO collection, based on their assignment to one of the four main phylogroups (A,B, C and D) described in the species (Table 1). Investigating host spectra via spotting tests showed that X₂₇ has lytic activity specific to eight strains of *O. oeni*, which were collected from wine, cider and kombucha and belong to the A, C and D phylogenetic groups. No cross-species viral infection was observed in the *Oenococcus* genus.

Table 1 X₂₇ phage productions on different *O. oeni* strains as represented by eop values

Tested strains and origin		Phage production on relevant strains		
		High 10 ⁻¹ < eop < 1	Medium 10 ⁻⁷ < eop < 10 ⁻¹	None eop < 10 ⁻⁸
<i>O. oeni</i>	Wine	PSU-1 (A) ; IOEB1491 (A)	IOEB0608 (A) ; Lalvin VP41 (A) ; IOEBS25 (A)	IOEBCiNe (A) ; S28 (A) ; VF (A) ; LAD2 (A) ; IOEBB10 (B) ; IOEB9805 (B) ; IOEB8413 (B) ;
	Cider	CRBO1381 (C)	C52 (C)	C23 (B) ; CRBO1384 (C)
	Kombucha		BL4 (D)	
<i>O. sicerae</i>	Cider			UCMA15228
<i>O. kitaharae</i>	Shochu			NRIC0647
	Water kefir			CRBO2176
<i>O. alcoholitolerans</i>	Cachaça			JP736 ; JP72/2

^a phylogroups in the *O. oeni* species (A to D) are indicated; high eops represent sensitive strains and medium eop suggests the presence of bacterial resistance mechanisms. Eop less than 10⁻⁸ indicate that the tested strains are fully resistant to X₂₇.

Sensitive strains of *O. oeni* with high or medium eop were found (Table 1). In particular, medium productive infections were obtained with five strains, including the commercial starter VP41. Closer examination revealed that infection of VP41 with X₂₇ led to both reduced eop value (2×10^{-2}) and plaque size, suggesting the presence of active resistance mechanisms against phage infection.

Eight strains were fully resistant and no individual plaques were formed in the presence of the pure or diluted lysates. They included the four tested strains from phylogroup B, of which LAD2. Interestingly, challenging the latter strain with X₂₇ revealed clear lysis in the first two dilution spots, with no individual plaques, nor any sign of lytic activity in further dilution spots. Yet, the halo was still present using a dialyzed phage lysate and spotting the same PFU. These results indicate that cell lysis results from a “lysis from without” mechanism with no virion production. It does not result from the exposure of the bacteria to phage-derived endolysins but rather to the lytic action of phage structural proteins. The latter are usually tail-associated components of the virion, and may degrade the peptidoglycan at multiple sites (14, 15) (Table 1).

Genome characterization of X₂₇. The phage genome has a 41,633 base pair (bp) genome with a mol % G+C content of 36.8. It carries 61 putative Open Reading Frames (ORFs), which are all positioned on the same DNA strand (Fig. 3). Three non-coding regions ranging from 304 bp to 364 bp are found in the phage genome. The larger region is located between ORF5 and ORF6 and contains 3 putative Rho-independent terminators, interspaced by 55-72 bp sequences, resembling small non coding RNAs produced by lytic phages to regulate various viral processes (16). tRNAs were not detected in the X₂₇ genome.

Genomic modules in X₂₇. All identified ORFs code for proteins of 30 amino acids (gp56), for the shortest, to 1619 amino acids (gp17), for the longest. All genes, but ORF1, use an ATG start codon. The salient genome characteristics are outlined in Supplemental Table S1, with a detailed list of best BLAST hits (BBH).

Any gene coding for an integrase, excisionase or repressor genes could be identified, confirming that the X₂₇ life cycle is strictly lytic. Five different genomic modules could be assigned to DNA packaging, head and tail morphogenesis, replication and lysis. This genomic organization is similar to that of most oenophages known to date (Fig. 3).

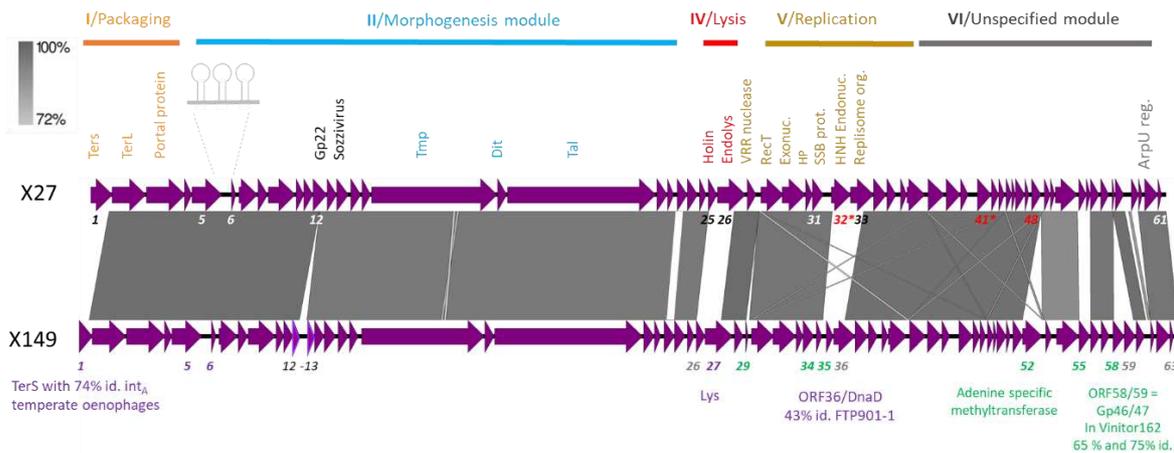


FIG 3 Genome comparisons between the X₂₇ and X₁₄₉ phages. The genome comparison was performed and visualized with Easyfig 2.2.2 (<https://mjsull.github.io/Easyfig/>). The functional gene groups (modules I to VI) are indicated in different colors. The gray regions between the genome maps indicate the level of identity from 72 to 100%. The information about the 6 genes specific to X₁₄₉ and the ORFs encoding shuffled proteins are written in green and purple, respectively.

Module I contains genes coding for components of the DNA packaging machinery. They include the terminase short (TerS) and large (TerL) subunits, and the portal protein, which together form the hole through which DNA enters the procapsid. Of note, *terS* has two possible start codons (TTG or GTG). However, initiation likely occurs with the GTG codon since an optimal 8-nucleotide spacer sequence separates it from the 5' AAGGAGG 3' Shine and Dalgarno site. The GTG start codon is frequently associated with *terS* in other characterized oenophages (6). Blastp analyses revealed that TerS from X₂₇ shares 71-72% sequence identity with corresponding proteins found in Int_D (Sozziviruses) and Int_E prophages of *O. oeni*. An HHPred analysis identified a 53 amino acid long central domain in TerS_{X27} similar to the DNA-binding domain of TerS from *Shigella flexneri* phage Sf6 (P. 99.31%, E-value: 6e-11). Comparison between TerL of X₂₇ and that of phages with known DNA packaging strategies (9), suggests that X₂₇ likely uses a *pac* mechanism (Supplementary Fig. S3). Based on these observations *ters*_{X27} was chosen as the arbitrary start of the genome (Fig. 3).

The morphogenesis module II encode proteins assembling the capsid (a scaffolding protein, a head protein and a major capsid protein), the connector (the portal protein and a putative head-to-tail joining protein) and the tail [a major tail protein, a tape measure protein (TMP), a tail fiber protein, the Distal Tail protein (Dit), the Tail-associated lysozyme (Tal), a tail assembly chaperone and a tail completion protein]. They were largely aligned with their orthologues from Int_D temperate oenophages and prophages of the LAB *Liq. satsumensis*,

which is associated to fermented beverages such as Shochu, kombuchas and kefir (17, 18). The Tal also contains a larger N-terminal domain of 337 aa which has identity to a protein from phage bIL285 infecting *Lc. lactis* (COG 4926). The TMP is 1619 aa long and comprises a 122 aa domain with similarity to a transglycosylase-like domain found in tail fibers (Cd13402; Prob. 99.16%, E-value: 6.2e-10), that catalyzes cleavage of the beta-1,4-glycosidic bond between N-acetylmuramic acid (MurNAc) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), as does egg-white lysozyme. It may correspond to the virion-associated lysin (VAL) domain responsible for the observed lysis from without event described with strain LAD2.

Module III is the lysis module. ORF26 codes for the endolysin (Lys_{x27}). There is no signal peptide involved in its secretion, unlike the well-known fog44 lysin (19). Of note, Lys_{x27} shares 69 % sequence identity with that of Vinitor₁₆₂. Endolysins targeting Gram-positive bacteria are characterized by a modular structure comprising an enzymatically active domain (EAD) for hydrolysis and a cell-wall binding domain (CBD) for peptidoglycan recognition (20). The predicted N-terminal EAD (1–216) of Lys_{x27} belongs to the glycoside hydrolase 25 (GH25) family, which hydrolyzes the β-1,4 glycosidic linkage between N-acetylmuramic acid (MurNAc) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) in bacterial cell walls. A similar domain is found in orphan lysozyme-related protein sequences in a variety of *O. oeni* and *Weissella sp.* strains (55–57 % id.) as well as in viral endolysins associated to human metagenomes (55% id.) (21). Surprisingly, the C-terminal domain of Lys_{x27} had fewer homologs than the EAD section in databanks and bioinformatic analysis was unable to identify a functional domain. HHPred analysis revealed a 73-aa segment with identity to the SPbeta prophage-derived uncharacterized protein YorP (P. 97,76%, e-value 0.00021). Lysis systems in Gram positive hosts require another component, the holin, which allows the endolysin to access the host cell wall. With few exceptions (22), holin-encoding genes (*hol*) overlap or are adjacent to lysin-encoding genes (*lys*). Intriguingly, blast analyses of genes upstream and downstream of ORF26 did not retrieve any holin-like protein orthologs, and globally, the deduced proteins aligned poorly with existing phage records. Phage holins are small proteins containing one, two or three transmembrane domains/helices (20, 23) and a charged C-terminal region. TMHMM search predicted the deduced protein of ORF25 (111 aa) as the most likely candidate. It would correspond to a type III holin structure with a single transmembrane region (amino acids 13–33), a N-terminal region located in the periplasm while the C-terminus of the protein is located in the cytoplasm.

Module IV contains genes associated to the replication of the phage genome including a putative virus-type replication-repair nuclease (ORF27), a replisome organizer (ORF33), two HNH-endonucleases (ORF32 and ORF37), and a single strand annealing protein (SSAP) of the RecT/Red β family (ORF28) (24). Phage SSAPs can be involved in different aspects of DNA metabolism throughout phage propagation (24, 25) and also substitute the classical bacterial recombinase RecA to allow recombination between dissimilar sequences. Hence, SSAPs are thought to facilitate genetic transfers between distant phages, and play an important role in the extensive genome modularity and mosaicism of temperate and lytic phages (24, 26, 27). As observed in *Bacillales* and *Lactobacillales* phages, two specific functions encoded in direct proximity of the phage-encoded *recT/red β* genes include a Cas4-like nuclease with a PD-(D/E)-XK domain (ORF29) and a single-strand binding protein (ORF31) (24). The RecT recombinase does not have homologs amongst wine-associated oenophages. Yet, it is related to a SSAP harbored by an Int_F prophage associated to *O. oeni* strains collected from kombucha (6) (46% identity, E-value 8e-71). The BBH outside of *O. oeni* (44% identity) is to a RecT protein of *Lc. lactis* (WP_259749449.1).

No clear delineation could be identified between module IV and the rest of the genome. Therefore, we arbitrarily grouped the right-end genes (ORF38 to ORF61) together into module V (Fig. 3). Overall, no functions could be assigned to most proteins of this module using either HHPRED or PFAM analyses. Only a conserved domain of ArpU-like transcriptional regulators was found in the protein encoded by ORF60. The deduced proteins from ORF41 and ORF48 resemble HNH homing endonucleases, which are often selfish genetic elements that exist free-standing or associated with inteins or introns (28). The best matches of these sequences were the putative NUMOD4 domain-containing protein of *Paenibacillus mucilaginosus* (E-value 5e-18 ; 48% identity ; locus tag B2K_02705) and the HNH endonuclease of the *Lactiplantibacillus plantarum* phage Satyr (E-value 4e-84 ; 68% identity ; locus tag: HOS71_gp029). We joined the two ORFs framing each HNH homing endonuclease and performed a BLASTn analyses. None of the resulting BLASTn hits spanned along the joint region suggesting that no gene was spliced by these HNH endonucleases.

The X₂₇ host adhesion device is an elongated and multi-domain machinery. Negative staining electron microscopy images of phage X₂₇ showed that it is formed by an icosahedral capsid of 57.5 ± 0.5 nm in diameter attached to a long and flexible tail of 246 ± 4 nm in length (Fig. 4). At

the tail distal end, the thin and elongated host adhesion device, involved in specific binding of yet unidentified receptors in the host cell wall, is similar to that of Vinitor162 (9). These characteristics classify X₂₇ to the newly proposed class Caudoviricetes (29). This is the most widespread taxonomic classification among currently characterized LAB phages, bearing in mind that most of them are of dairy origin (30).

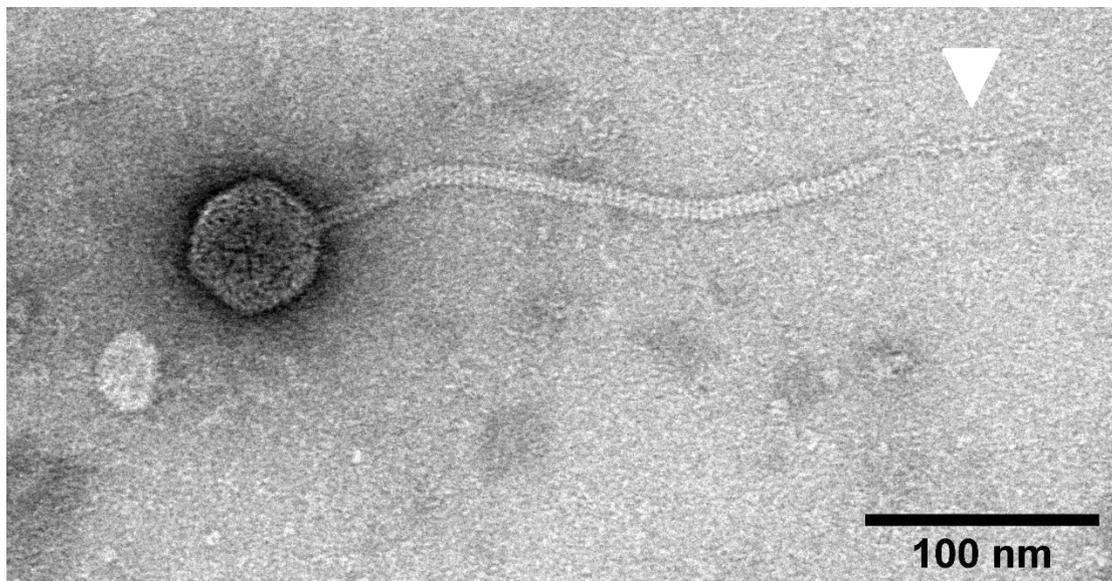


FIG 4 Observations of phage X₂₇ by TEM. The white arrows shows the terminal tail fiber.

The core of siphophage host adhesion devices always consists of an hexameric D_{it} contacting on one side, the last ring of Major Tail Proteins, and, on the other side, a trimer of T_{al} (31). Other components, including receptor-binding proteins (RBPs) and various fibers, may associate to this common scaffold, leading to a structural and functional diversity of host adhesion devices. HHPred analysis of potential proteins assembling the host adhesion device (proteins encoded by genes in between the *tmp* and *lysin*) revealed that the X₂₇ host adhesion device is formed of a short D_{it} (121 amino acids) and a long T_{al} and does not contain RBPs. This composition is similar to that of the oenophage Vinitor 162 host adhesion device, although the D_{it} of Vinitor 162 is longer and contains a C-terminal galectin domain (10). In order to gain insight into structure-function relationships of this machinery, we used AF2 to predict the structure of both proteins (Fig. 5).

The D_{it} of X₂₇ is only formed by the belt domain (32), which returned the belt domain of the D_{it} from *Lactococcus lactis* phage p2, using the Dali server (Fig. 5). Moreover, AF2 predicted an hexameric assembly resembling that of the D_{its} of known structures (33, 34, 35, 36). Since

the Tal of X₂₇ exceeds the upper limit of ~ 1,400 amino acids for GPU calculations on the notebook's servers, we split its sequence into several overlapping segments, predicted the trimeric structure of each of them, and joined these segments together to assemble the whole Tal structure (Fig. 5).

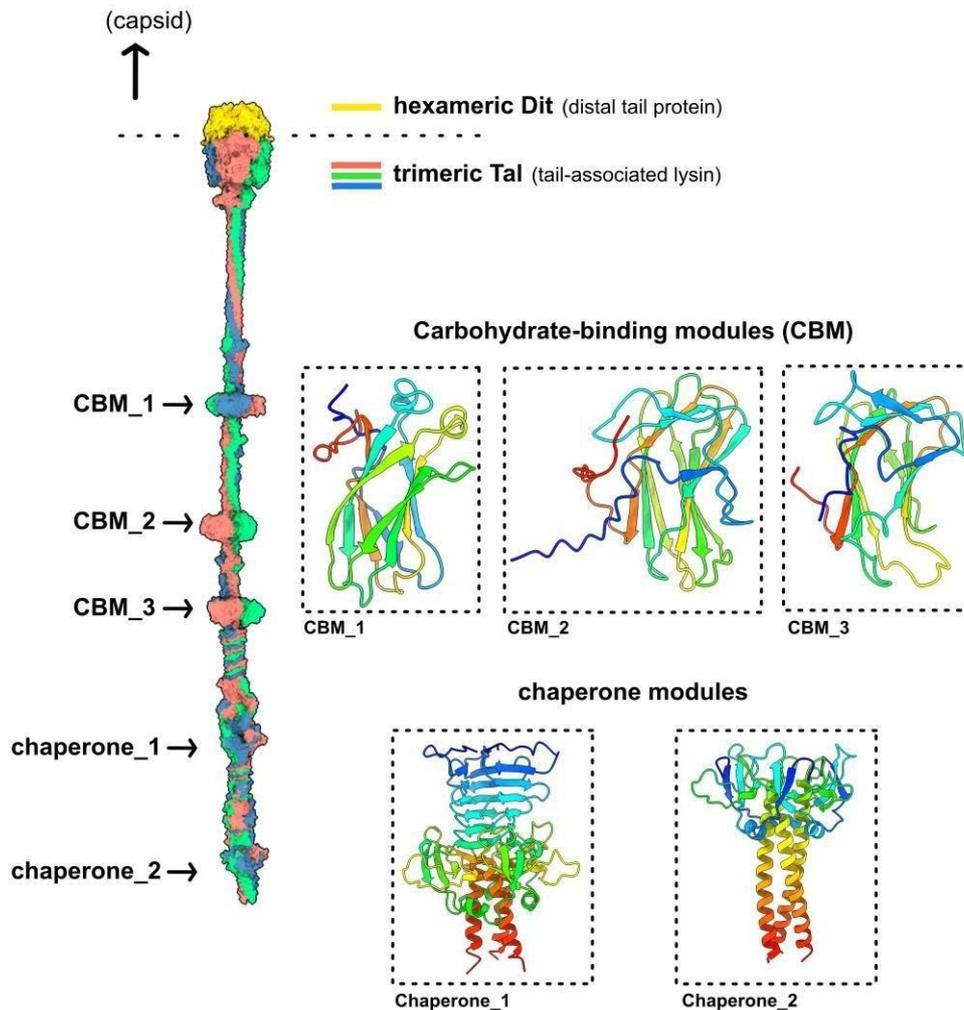


FIG 5 Topological model of the X₂₇ adhesion device based on the structure predictions of DIT and Tal

The Tal starts with a structural domain (1-350), related to the myophage T4 tail component gp27 (37) (Fig 5), which is commonly found in phage Tal proteins, as well as in bacterial Type 6 secretion systems (38). This N-terminal domain is followed by a small domain encompassing three β -strands, which we named '3 β ', that does not have structural homologs in the Protein Data Bank (PDB) (Fig. 5). This domain likely plays a structural role. The central region of the Tal extension harbors three well-defined domains, identified as CBMs using Dali, interspaced

by collagen-like helical motifs of variable lengths (residues 420-1206) (Fig. 5). The CBM_1 (residues 598-724), CBM_2 (residues 838-980), and CBM_3 (residues 1080-1206) returned a CBM16 fold, according to the CAZy nomenclature (39) (Fig 5). Lastly, the Tal C-terminal region (residues 1229-1914) presents a series of structures characteristics of phage tail tips or tail fibers (40, 41, 42). These include β -helical domains (residues 1229-1298 and 1557-1584) and β -prisms (residues 1300-1447 and 1629-1790). Moreover, each of the β -prism/ β -helix tandem is terminated by a globular domain made up of β -strands, α -helices and long loops (residues 1454-1547 and 1810-1914), which returned hits with intramolecular chaperone that mediate proper β -helix folding (41, 43) (Fig. 5). Such intramolecular chaperones are auto-proteolytically released once β -helices are formed, which may, in turn, expose receptor-binding domains as observed in the T5 L-shaped fiber (41). However, the presence of two intramolecular chaperones in the X₂₇ host binding device questions about the structure and function of the mature assembly.

X₂₇ and X₁₄₉ represent two species in the new genus named Krappator. Continuous surveys of oenophages (6, 8) resulted in the identification of two additional phages with similar characteristics, which were named X₂₈ and X₁₄₉. As for X₂₇, they were also collected from Merlot red wines. Yet, the three available phages were obtained from distinct wineries around Bordeaux, fermentation steps (must, AF and MLF for X₂₇, X₂₈ and X₁₄₉, respectively) and millesimes (2014 for X₁₄₉ and 2015 for X₂₇ and X₂₈). The genomic sequences of X₂₈ and X₁₄₉ were determined and compared to that of X₂₇ to assess their relationships. The X₂₇ and X₂₈ genomes share a 99,9 % sequence identity at the nucleotide level, as tested reciprocally and contain the same number of predicted ORFs. In contrast, the genome of X₁₄₉ is slightly larger with 42,545 bp and has 63 predicted ORFs. Although both X₂₇ and X₁₄₉ genomes show complete collinearity (Fig. 3), they only share a 85,8 % sequence identity (VIRIDIC). We conclude that X₂₇ and X₁₄₉ represent two new phage species, based on the main species demarcation criterion of 95% (29, 44). Both phages are unique since their genome sequences share ANI of < 1% with other phages in public databases. The higher observed similarity was 86% albeit with very small sections (2% coverage) of the Vinitor 162 and IntD₉₈₀₅ oenophages. Therefore, the novel phages define a new genus of siphophages, that we named Krappator.

To better analyse the genetic relationship between the sequenced phages and other

oenophages, a phylogenetic tree was established by VICTOR and is given in Fig. 6. For comparison, we chose representative oenophages, which based on multiple genome alignments were previously reported to form two distinct clusters (45). The obtained results show clustering of the Krappator phages examined in this work, which confirms their high genome similarity (Fig. 6). Krappator phages belong to cluster II and the unclassified branch represented by X₂₇ and X₁₄₉ phages is distant from the strictly lytic Vinitor phages (cluster II. 2). Yet, Krappator and temperate phages of the Int_D and Int_E as well as a prophage associated to *O. sicerae* (45) are shown to cluster more closely together within cluster II. 1. Based on comparative analyses of whole-genome sequencing data obtained in this study, the highest level of phage similarity within cluster II.1 was assigned to the morphogenesis region.

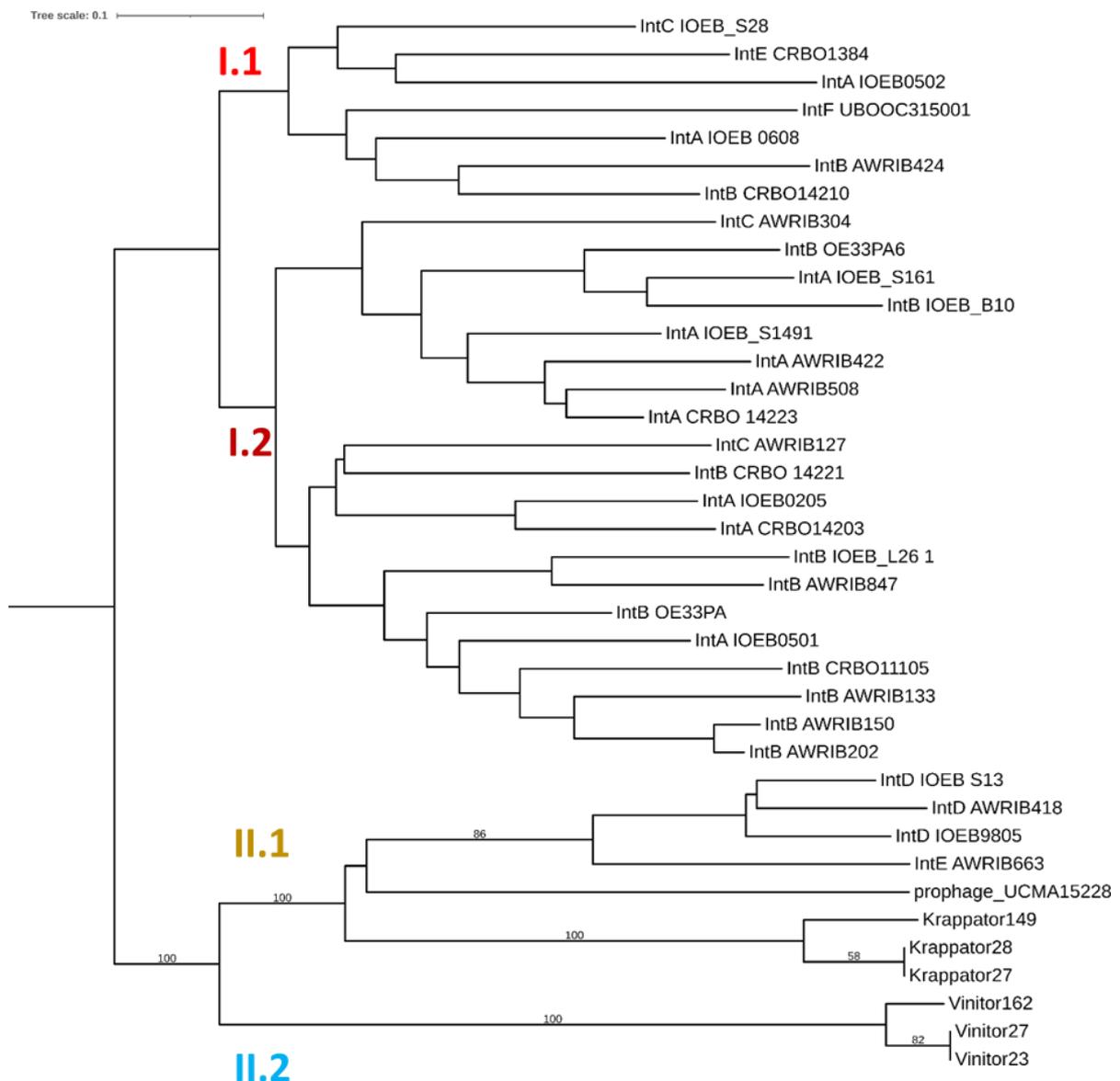


FIG 6 Phylogenetic tree of sequenced oenophages showing two major clusters. Int_{A,F} indicates the six distinct integrase groups described for temperate oenophages. Prophage_UCMA15228 is harbored by *O. sicerae* UCMA15228 and has been earlier described (45).

Differences between X₂₇ and X₁₄₉. Despite the high homology of the genome sequences, several features (described earlier) were recognized as differentiating factors among the two studied phages. First, X₂₇ and X₁₄₉ primarily differed in the complement of small accessory and unique proteins in module V. An apparent loss/gain of certain ORFs was evident in the sequenced genomes and confirmed by PCR. Consequently, each representative of the Krappator group had a small set of specific ORFs (5 in X₂₇ and 6 in X₁₄₉) (Supplemental Table S1, Fig. 3). They included ORF52_{X149} coding for an adenine-specific methyltransferase, which is a DNA modification enzyme. A BLASTp search revealed orthologues in the genomes of various human metagenome-associated phages (21), lactophages (46) as well as uncharacterized prophages of fruit-loving Fructilactobacilli. Along with the methyl transferase, ORF58_{X149} encodes an hypothetical protein related to Gp46 from Vinitor₁₆₂. Both X₂₇ and X₁₄₉ phages harbor the gene specifying the Gp47 homolog (ORF59_{X149} and ORF56_{X27}) suggesting that some deletion events occurred upstream of ORF56 in X₂₇. These comparisons support the hypothesis that the generation of diversity occurs in module VI by recombination events and that the identified genes in the region likely encode adaptive functions. Their exact role is intriguing as they correspond to database orphans.

Another differentiating factor between X₂₇ and X₁₄₉ was the presence of three deduced multidomain proteins with similar predicted functions (TerS, Lys and Replisome organizer) and yet high modularity, suggesting the shuffling of modules of protein structure. For each protein, the similarity was most pronounced in the C-terminal parts, whereas the N-termini had diverged considerably between both phage genomes (Supplemental Fig. S6). We first observed extensive divergence among the TerS proteins within the two Krappator phages and data are provided in Fig. S6. Hence, TerS_{X149} lacked the small N-terminal domain of 34 aa with helix-turn-helix motives found in TerS_{X27}. This section has identity to the N-terminus of small Terminases from phages associated to fruits and insects (Supplemental Fig. S6). Two other remarkable sections absent in X₁₄₉ were a 25 aa-domain containing KVA repeats and a 39 aa domain which both matched with TerS sequences recently identified in Int_D and Int_E temperate

oenophages (6). Last, a divergent 58 aa central section (Supplemental Fig. S6) with high identity to phage terminases from lactobacilli was specific of TerS_{X149}. Mosaic boundaries were identified near the C-terminus of both TerS proteins, which delineated an identical 45 amino acid domain, with identity to the C-terminal section of the TerS protein of the temperate Lactobacillus phage Phig1e (47). X₂₇ and X₁₄₉ phages had the same combination of TerS C-terminal section and TerL protein types. Such conservation suggests its importance for the interaction between TerS and TerL as proposed in other model phages (48). Owing to literature, the N-terminus and central section of TerS are suggested to be responsible for binding properties to DNA and oligomerization mechanisms, respectively. Whether and how the presence of divergent sequences impacts encapsidation remains to be established. Of note, we tried to take advantage of the presence of an additional *Bam*HI sites in the vicinity of *terS* and *terL* in the genome of X₁₄₉ to localize more precisely the *pac* site. Consistent with the idea that X₁₄₉ uses a *pac* strategy, electrophoresis revealed submolar DNA fragments upon digestion of phage DNA with both enzymes (Supplementary Fig. S7). However, due to the lack of accuracy of the measurement of the size of the restriction fragments, we could not determine whether the X₁₄₉ *pac* site lies in the bp 1-718 interval within the 5' end of *terS* gene, or in the intergenic 300 bp region upstream of the ORF, which shows 92% nucleotide identity. The second protein with apparent shuffling is the endolysin. The protein sequences of Lys_{X27} and Lys_{X149} contained a conserved CBD, with 87,8 % identity to the endolysins from the Vinitor oenophages. Yet, we observed a disparity between the trees for the EAD sections, suggesting that these domains have had separate evolutionary histories. BBH were observed with GH25 family lysozymes from *Lactobacillus gallinarum* (43% id., locus tag FC37_GL000770) and *Weissella paramesenteroides* (57% id. %; locus tag KGP42_04260), respectively. This is supporting the idea that Lys_{X27} and Lys_{X149} are natural chimeras, indicating that horizontal gene transfer by recombination-driven interchange of endolysin modules occurs naturally within LAB phage populations. Future work will be necessary to compare the activity of both proteins found in X₂₇ and X₁₄₉ against oenococci. Indeed, preliminary data show that cell lysis upon infection by X₁₄₉ is 24-48 hours delayed compared to infection by X₂₇. Further evidence of modular shuffling is provided by the comparisons of the replisome organizer corresponding to ORF33 and ORF36 in X₂₇ and X₁₄₉, respectively. Both shared a C-terminal DnaD domain with 45% identity to a HP in the P335-type phage 6890 of *Lc. Lactis*

(locus tag D6890_040). Yet, the BBH of the N-terminal fragments of 148 a corresponded to replication proteins associated to prophages in *Liq. satsumensis* (locus tag KBX31_11260) and *Weissella oryzae* (locus tag WOSG25_210040), respectively. A possible linker between both domains was observed in ORF33. It corresponds to a 5'AATGAC3' sequence which was repeated four times, resulting in the presence of a NDNDNDNDN domain in the protein.

Last, albeit the overall composition and architecture of the host adhesion devices of both Krappator phages were highly conserved, with their Dit and Tal sharing 100% and 96% sequence identity, respectively (Supplemental Fig. S4 and S5), mapping of amino acids variations in the Tal predicted structure highlighted a X₁₄₉-specific cluster in CBM_1 spanning the potential U-shaped saccharide-binding pocket. This suggests that Krappator phages' CBM_1 may be a receptor-binding domain mediating host-specific saccharide recognition. Further work is needed to assess whether this may result in differences in the host spectra of the phages.

DISCUSSION

The present work contributes to expand the current knowledge about the biodiversity of phages infecting *O. oeni* through the characterization of a novel genus of strictly lytic siphophage called Krappator, and its representative member X₂₇. The lysis parameters of the phage (lysis times and burst sizes) as measured in MRS broth are in agreement with the values reported for other oenophages (P58I, P58II, 1002, LcO23, S1.1S and OE33PA) (5). More importantly, X₂₇ was shown to infect and kill its host in grape juice, supporting the idea that Krappator may influence the overall microbial community composition over wine fermentation. The point that members of the Krappator group were collected at varying points in time from different wineries and fermentation steps (must, AF and MLF) is reinforcing the the potential risk of delayed MLF due to this novel phage-type.

Much remains to be done in order to establish why white grape juice is less permissive to phage infection than red grape juice. Differences in the quantity and the nature of the phenolic compounds (PC) present in both juice may explain our observations. In particular, specific PC present in white grape juice may interfere in the process of phage adsorption to bacterial receptors and/or subsequent steps of the lytic cycle. In a recent study, we proposed that PC may directly interact with the RBP of the oenophage OE33PA (6). An hypothesis of this research was that flavonoids may occupy a cavity present at the surface of the RBP, which is

dedicated to the docking onto the host receptors, and therefore compete with adsorption on the cell wall (6). Alternately, the presence of PC in grape juice may limit the synthesis and/or phage access to cell wall receptors. A notable example is the role of Propolis, a bee product, on various LAB from the oral cavity (49). A cell wall binding function has been postulated for the compound, which includes a variety of flavonoids and phenolic acids. It can also inhibit cell envelope synthesis as well as the expression and activity of various glycosyltransferases (49, 50). Although the nature of the bacterial receptors remains elusive in *O. oeni*, our scientific knowledge and understanding on host-encoded receptors of LAB-infecting phages have grown immensely in recent years. Most characterized phages interact with surface glycans, which include either polysaccharides anchored to the peptidoglycan, exocellular polysaccharides associated with the cell surface or wall teichoic acids (51, 52). More importantly, the molecular and biochemical steps involved in the assembly of such constituents have been deciphered and a pivotal role of glycosyltransferases in their decoration has been pointed out (52). Future work should now aim to isolate and characterize bacterial insensitive mutants in *O. oeni*, as these data will complement our current approach to analyse the phage tail tip. We used AlphaFold2 to obtain a 3D model of the adhesion devices' components and successfully reconstructed the topology of the tail tip. Like for many other LAB phages, these devices found in X₂₇ contain a combination of carbohydrate-binding modules likely functioning as receptor-binding domains. Yet, the Krappator's elongated and multi-domain host adhesion device differs from those of other LAB phages whose structure has been characterized. For example, the functionality of the decorating CBMs and putative chaperones needs further investigation.

Such differences are not unexpected and emphasize the currently limited availability of data on phage-host interactomes in plant-derived LAB while much effort has been put forth to characterize the biodiversity of LAB and their phages that thrive in dairy fermentations (53). Accordingly, genomic analyses of Krappator phages revealed substantial novelty and diversity compared to other LAB phages. The Krappator phages belong to cluster II of oenophages, which so far comprises the strictly lytic Vinitor (5, 9) as well as the Int_D temperate oenophages, also called Sozziviruses (6). Phages from this specific cluster are not all exclusive to the *O. oeni* host species in their infections, and we observed their close relatedness with a recently described prophage harbored in *O. sicerae* (45). This is consistent with our recent exploration of CRISPR loci in the *Oenococcus* genus, which showed potentially recent and also ancient

infections between *O. sicerae* and phages of *O. oeni* (54). Both species co-exist in cider (1). Tailed phage genomes consist of gene blocks of "modules" that may be exchanged to produce new phage species. Our current genomic comparisons suggest module shuffling and DNA exchange between Krappator phages and other members of cluster II and the exchanged modules form the *Siphoviridae* tails. A convergence of data shows that phage genetic mosaicism is the product of recombination at sites of limited homology between genomes which is driven by phage encoded recombinases, similar to that found in both Krappator phages (55). Alternately, illegitimate recombination can also occur between unrelated genomes and both mechanisms are not mutually exclusive (26, 56). Both unity of time and unity of place are also required for phages that exchange materials and three scenarios have been recently proposed to explain co-infection (26). First, two virulent phages may infect a bacterium at the same time. Second, transfer between phages of different lifestyles may occur when virulent and temperate phages co-infect a bacterium, or when virulent phages infect a lysogen. Another interesting finding is that Krappator phages evolve by shuffling interchangeable functional modules in specific proteins. In agreement with recent data (56), the domain-based protein modularity was observed in the endolysin, the replisome organizer and the small terminase unit. Shuffling therefore appears to be an evolutionary strategy among Krappator phages to allow rapid adaptation to available hosts in their environment to ensure their continued success.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. We used 18 strains of the *O. oeni* species which originated from different beverage (wine, cider, kombucha and water kefir). We also included two strains of *O. kitaharae* previously obtained from Shochu, a traditional Japanese liquor (57) and from water kefir (58) as well as strains *O. alcoholitolerans* JP736 and 72/2 provided by Prof. De Morais (Federal University Pernambuco, Brazil). All bacterial strains were obtained from the Centre de Ressources Biologiques Oenologiques (CRB Oeno, ISVV, Villenave d'Ornon, France).

Strains were routinely grown in MRS medium (Difco) at 25°C. Alternately, media grape juice were used. Red Grape Juice (RGJ) medium contains 25% (v/v) of commercial red grape juice (Reflets de France, Carrefour, Bordeaux, France), 0.5% (w/v) of yeast extract, and 0.1% (v/v) of Tween 80. Commercial red grape juice was replaced with commercial white grape juice to prepare White Grape Juice (WGJ) medium. MLO medium (59) contains casein peptone (10 g/L), yeast extract (5 g/L), Tween 80 (1 g/L), sodium citrate (3.5 g/L), MgSO₄ · 7 H₂O (0.2 g/L), MnSO₄ · 7 H₂O (0.05 g/L), glucose (10 g/L), fructose (5 g/L), and tomato juice (100 mL). The pH of the media was adjusted to 4.8 using

a concentrated HCl solution (37%). Solid media were prepared by adding 2.5% (w/v) of agar (Thermo Fisher Scientific, Bordeaux, France). All media were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 minutes.

Propagation of Krappator phages. Amplification of X27 on the bacterial host was carried out in MRS broth supplemented with MgSO₄ (3.75 g/L) and CaCl₂ (2.375 g/L) (MRS) as follows. A liquid culture (10 mL at OD 0.3) was infected with 100 µL of phage lysate and incubated 3 days at 25 °C. It was centrifuged upon lysis at 10,000 x g for 10 min. The supernatant was filtered through a 0.22 µm polyethersulfone (PES) membranefilter (Jao, 2013). Ten-fold serial dilutions of the fresh lysates were prepared in phage buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.1 M NaCl; 8 mM MgSO₄). Phage were enumerated using the classical double-layer plating technique (Gratia). MRS agar plates were incubated in jars under anaerobic conditions using GasPak™ EZ sachets (Thermo Fisher Scientific, Bordeaux, France) for 5-7 days at 25 °C.

Optimal multiplicity of infection in liquid infection of IOEBS277 by X27. The IOEBS277 strain was grown to OD 0.05 in MRS broth (100 mL). The culture was distributed into 9 mL aliquots. Volumes of 1 mL of phage X27 and dilutions thereof were added to the cultures to yield multiplicities of infection (MOI) ranging from 10⁻² to 10⁻⁶. A control with no added phage was prepared. All tubes were incubated at 25 °C and visually examined after 3 days.

TEM observations. A 50 ml phage lysate was centrifuged at 20,000 x g for 2 hours. The pellet was air-dried and resuspended in 50 µl of water. A volume of 10 µL (~10⁹ PFU/mL) was deposited on a carbon-coated copper grid for 30 sec, then colored it with uranyl acetate (saturated in water pH 4.5) for 30 sec. The phage was observed with a Hitachi H7650 electron microscope operated at 80 kV. Cyto- microscopy was done as previously described (4).

Host spectra of X27. The X27 phage lysate was dialyzed against 500 mL of SM buffer (100 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 8 mM MgSO₄) for 3 hours at 4 °C, with one buffer change. A Float-A- Lyzer®G2 Dialysis Device MWCO 100kDa (Sigma-Aldrich, France) was used according to manufacturer's directions. The propagation of the phage was tested on a panel of *O. oeni* and *O. kitaharae* strains as follows. The phage lysate was spotted (8 µL) in duplicates at eight concentrations (10⁹ to 10² PFU/mL) onto those selected potential hosts. The resistance level of bacterial strains to the phage was expressed using the efficiency of plating (EOP) ratio. The EOP was defined as the ratio between PFU/mL obtained on each putative resistant strain and PFU/mL obtained on the strain initially used for the phage propagation (*O. oeni* IOEB S277). The EOP value was classified as "High production" when the ratio ranged from 1 to 10⁻¹. An EOP between 10⁻² and 10⁻⁷ was considered to be of "Medium production" efficiency. Last, an EOP under 10⁻⁸ was classified as inefficient and corresponding strains were considered as resistant strains.

Adsorption experiments. Cells in early exponential phase growth (2 ml with an OD₆₀₀ of 0.2) were centrifuged at 10,000 x g for 10 min. The pellet containing approximately 8x10⁸ cfu was resuspended in 1600 µl of fresh MRS broth. The phage lysate was placed at room temperature for 15min. A volume of 400 µL of diluted lysate (corresponding to ~ 2.7 x 10⁶ PFU) was prepared and added to the 1600 µL sample, to yield a MOI of 0.003. The 2 mL sample was immediately homogenized and a volume of 200 µL (T0) was immediately collected, centrifuged (10,000 x g, 5 min) and filtered. The

rest of the sample was equally distributed in 4 tubes which were placed at 25 °C in a water-bath. They were periodically removed after 20, 30, 40 and 60 min, and centrifuged. All supernatants were serially diluted and titrated on strain IOEBS277 to give the concentrations of free (unbound) phages over time.

One step growth and burst size. A 2 mL adsorption assay was prepared as described above. A volume of 200 µL was immediately removed at T₀, centrifuged and filtered. The infected culture was incubated at 25 °C for 60 min to allow phage adsorption. After this period, removal of unadsorbed virions was performed by centrifugation of the 1.8 mL sample (10,000 x g for 5 min at 4 °C). Supernatants collected at T₀ and T₆₀ were titrated in order to measure adsorption rate. The pellet containing infected cells was gently resuspended in 10 mL of pre-heated MRS broth. A volume of 500 µL was removed and added to 29.5 mL of MRS broth. The diluted infected cells were distributed in 2 mL samples, which were incubated at 25 °C. Samples were withdrawn over time for use in an infectious center assay following centrifugation.

The burst size was the ratio of phages produced to the initial number of infective centers. It was calculated as the ratio of the final count of liberated virions at the end of the burst period to the initial count of infected bacterial cells at the beginning of the latent period. The lysis time was the number of hours before the increase in plaque number occurred. Three replicate experiments were conducted to estimate adsorption rate, burst size and lysis time.

Isolation of bacteriophage insensitive mutants (BIMs). Phage X₂₇ was mixed with its host cell culture (10⁸ CFU/ml) at MOI of 0.003 and incubated at 25°C. Lysis was complete after four days and regrowth occurred progressively. At day 12 (OD 1), ten-fold serial dilutions prepared from the mixture were plated on MRS agar. A colony was isolated and restreaked three times on RGJ plates and used in a second infection trial. A single isolate called BIM5.1 was validated by phage sensitivity assays and was subjected to MLVA profiling as recently described (5) to confirm their relatedness to the relevant parent strain from which it was derived.

PCR tests. A Biorad i-Cycler was used for the amplification reactions, which were achieved in a 25 µL volume using the Biorad Taq PCR Master Mix kit and 0.2 µmol/L of each primer. The phage DNA released by heat lysing of particles (10³ PFU per reaction) served as template for PCR. All oligonucleotides are listed in Table 2 and were purchased from Eurofins MWG-Operon (Munich, Germany).

Genome sequencing, genomic comparisons and phylogenetic analyses. The phage lysate was concentrated by ultracentrifugation and double-stranded DNA was extracted as described previously (4, 5). Whole-genome sequencing was performed at the Genome-Transcriptome facility of Bordeaux (<https://pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr>). DNA libraries were prepared using the Nextera XT DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA). Genomic DNA was sequenced using an Illumina MiSeq using 2 x 250 bp paired-end libraries. Reads were assembled using SPAdes (60) with default parameters (read correction and assembler). The assembly of the whole-genome sequences was verified

using *Hind*III- *Eco*RI- and *Bam*HI-restriction profiles of phage DNAs and gel electrophoresis.

The *in silico*-translated protein sequences were used as queries to search for sequence homologs in the non-redundant protein database at the National Centre for Biotechnology. Deduced proteins were searched for function using BLAST v2.10.0 and a cutoff E value of 0,001. Searches for distant homologs were performed using HHpred (61) against different protein databases, including PFAM (Database of Protein Families), PDB (Protein Data Bank), CDD (Conserved Domains Database) and COG (Clusters of Orthologous Groups), which are accessible via the HHpred website. Searches against the CDD database at NCBI were also performed using CD-search (62). The online analysis tools Arnold (63), which predicts the existence and location of Rho-independent transcription terminators employing RNAmotif and ERPIN complementary programs and TMHMM (64) were used.

Host adhesion device structure prediction. X₂₇ protein sequences encoded by genes located inbetween the *tmp* and *lysin-holin* were submitted to HHpred (65). Structure predictions were performed on the Dit and Tal proteins using an AlphaFold2 GitHub notebook.

<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb#scrollTo=XUo6foMQxwS2>). To note, this notebook does not use PDB templates (as do 'true' AlphaFold2 servers), thereby providing a totally naive structure prediction. Furthermore, this ColabFold allows the modeling of homo-multimers. The structure of Dit was predicted as a monomer and as a hexamer. Due to memory limitations, the long Tal was split in distinct stretches with large overlapping regions for later assembly. Monomeric and trimeric structures were predicted for each of them. Structure of the full-length Tal was obtained by superimposing the overlapping regions onto each other using Coot (66). AF2 provides an index called predicted local distance difference test (pLDDT) estimating the prediction accuracy along the protein chain, from 0 to 100 (best). In practice, pLDDT values over 80-90 compare to average resolution crystal structures. The pLDDT values, which are stored in the pdb files as B-factors, were plotted using Excel. The final predicted domain structures were submitted to the Dali server (68) to identify the closest structural homologs in the PDB. Sequence alignments were performed with Multalin (69) and ESPript (70). Structure analyses and visual representations were performed with ChimeraX (71).

Data availability. The full genomes of *O. oeni* phages Krappator X27, X28 and X149 were deposited in GenBank under the accession numbers XX, YY and ZZ. Structural models are provided in Supplementary material.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1 and Fig. S1 to S7 are given below.

COMPETING INTEREST

C.C. is employee of Alphagraphix (cambillau.alphagraphix@gmail.com)

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-21-CE11-

0018-01). UCSF ChimeraX, which was used for molecular graphics and analyses, was developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from the National Institutes of Health R01-GM129325 and the Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

REFERENCES

1. Lorentzen MPG, Lucas PM. 2019. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:2937-2945.
2. Viridis C, Sumbly K, Bartowsky E, Jiranek V. 2021. Lactic acid bacteria in wine: technological Advances and evaluation of their functional role. *Front Microbiol* 11:612118.
3. Liu D, Zhang P, Chen D, Howell K. 2019. From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Front Microbiol* 10:2679.
4. Philippe C, Chaïb A, Decossas M, Philippe C, Claisse O, Lambert O, Le Marrec C. 2018. Isolation and cryoTEM of phages Infecting wine spoilers. *Bio-protocol* 10(21):e3801.
5. Chaïb A, Claisse O, Delbarre E, Bosviel J, Le Marrec C. 2022. Assessment of the lysogenic status in the lactic acid bacterium *O. oeni* during the spontaneous malolactic fermentation of red wines. *Food Microbiol* 103:103947.
6. Claisse O, Chaib A, Jaomanjaka F, Philippe C, Barchi Y, Lucas PM, Le Marrec C. 2021. Distribution of prophages in the *Oenococcus oeni* species. *Microorganisms* 9:856.
7. Costello PJ, Kolouchova R, Jordans C, McCarthy J, Schmidt SA. 2021. Analysis of transcriptomic response to SO₂ by *Oenococcus oeni* growing in continuous culture. *Microbiol Spectr* 9 :e0115421.
8. Philippe C, Jaomanjaka F, Claisse O, Laforgue R, Maupeu J, Petrel M, Le Marrec C. 2017. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int J Food Microbiol* 257:138-147.
9. Philippe C, Chaïb A, Jaomanjaka F, Claisse O, Lucas PM, Samot J, Cambillau C, Le Marrec C. 2021. Characterization of the first virulent phage infecting *Oenococcus oeni*, the queen of the cellars. *Front Microbiol* 10.3389/fmicb.2020.596541.
10. Goulet A, Cambillau C. 2021. Structure and Topology Prediction of Phage Adhesion Devices Using AlphaFold2: The Case of Two *Oenococcus oeni* Phages. *Microorganisms* 9(10):2151.
11. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, *et al.* 2021a. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596 :583–589.
12. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, Green T, Zielinski M, Zidek A, *et al.* 2021. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 596:590–596.
13. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T *et al.* 2021b. Applying and improving AlphaFold at CASP14. *Proteins*, 89(12): 1711–1721.

16. Fernandes S, São-José C. 2018. Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers. *Viruses*, 10(8):396-15.
17. Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. 2019. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Front Microbiol* 10:2949.
18. Bloch S, Lewandowska N, Węgrzyn G, Nejman-Faleńczyk B. 2021. Bacteriophages as sources of small non-coding RNA molecules. *Plasmid* 113 :102527.
19. Endo A, Okada S. 2005. *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:83-85.
20. Nyhan, Laura M., Kieran M. Lynch, A, Sahin, W, Arendt EK. 2022. Advances in Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Appl Microbiol* 2: 73-103.
21. São-José C. 2018. Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2) :29.
22. Catalão MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, São-José C., Pimentel M. 2013. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 554–571.
23. Tisza MJ, Buck CB. 2021. A catalog of tens of thousands of viruses from human metagenomes reveals hidden associations with chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:23.
24. Lu N, Sun Y, Wang Q, Qiu Y, Chen Z, Wen Y, Wang S, Song Y. 2020. Cloning and characterization of endolysin and holin from *Streptomyces avermitilis* bacteriophage phiSASD
25. Kyrkou I, Carstens AB, Ellegaard-Jensen L, Kot W, Zervas A, Djurhuus AM, Neve H, Franz CMAP, Hansen M *et al* Hansen LH. 2020. Isolation and characterisation of novel phages infecting *Lactobacillus plantarum* and proposal of a new genus, "Silenusvirus". *Scientific reports*, 10(1):8763.
26. Steczkiewicz K, Prestel E, Bidnenko E, Szczepankowska AK. 2021. Expanding Diversity of Firmicutes Single-Strand Annealing Proteins: A Putative Role of Bacteriophage-Host Arms Race. *Frontiers in microbiology*, 12, 644622.25.
27. Neamah MM, Mir-Sanchis I, López-Sanz M, *et al.* 2017. Sak and Sak4 recombinases are required for bacteriophage replication in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 45(11):6507-6519.
28. Moura de Sousa JA, Pfeifer E, Touchon M, Rocha EPC. 2021. Causes and consequences of bacteriophage diversification via genetic exchanges across lifestyles and bacterial taxa. *Mol Biol Evol*, 38(6):2497-2512.
29. Labrie, S. J., *et al* Moineau, S. 2007. Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages. *J. Bact.* 189(4) :1482- 1487.
30. Gogarten JP, Hilario E. 2006. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol Biol.* 6:94.
31. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506. 27.

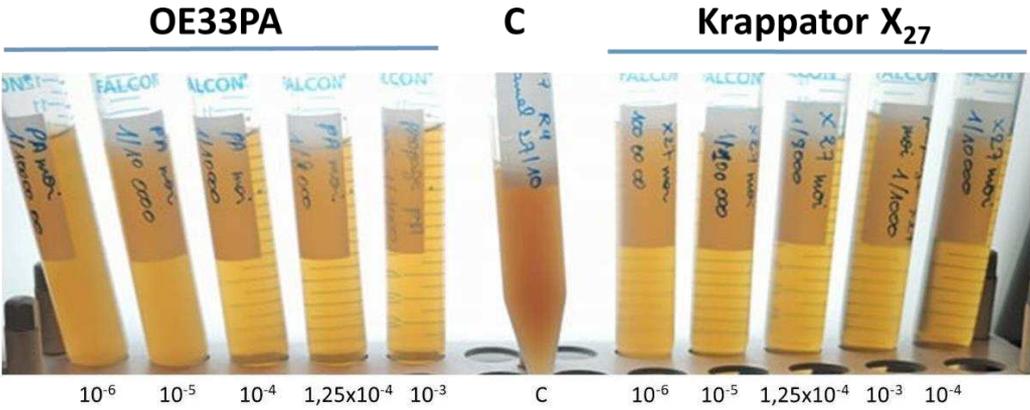
32. White K, Yu JH, Eraclio G, Dal Bello F, Nauta A, Mahony J, van Sinderen D. 2022. Bacteriophage- host interactions as a platform to establish the role of phages in modulating the microbial composition of fermented foods. *Microbiome Res Rep* 1(1):3.
33. Goulet A, Spinelli S, Mahony J, Cambillau, C. 2020. Conserved and Diverse Traits of Adhesion Devices from Siphoviridae Recognizing Proteinaceous or Saccharidic Receptors. *Viruses*, 12(5):512.
34. Veessler D, Robin G, Lichiere J, Auzat I, Tavares P, Bron P, *et al.* 2010. Crystal structure of bacteriophage SPP1 distal tail protein (gp19.1): a baseplate HUB paradigm in gram-positive infecting phages. *J Biol Chem* 285 :36666–36673.
35. Sciara G, Bebeacua C, Bron P, Tremblay D, Ortiz-Lombardia M, Lichiere J, *et al.* 2010. Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:6852–6857.
36. Flayhan A, Vellieux FM, Lurz R, Maury O, Contreras-Martel C, Girard E, *et al.* 2014. Crystal structure of pb9, the distal tail protein of bacteriophage T5: a conserved structural motif among all siphophages. *J Virol* 88 :820–828.
37. Veessler D, Spinelli S, Mahony J, Lichiere J, Blangy S, Bricogne G, *et al.* 2012. Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:8954–8958.
38. Bárdy P, Füzik T, Hrebík D, Pantůček R, Thomas Beatty J, Plevka P. 2020. Structure and Mechanism of DNA Delivery of a Gene Transfer Agent. *Nat Commun* 11:3034.
39. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, *et al.* 2002. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415 :553–557.
40. Veessler D, Cambillau C. 2011. A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:423–433.
41. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate- active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nuc acids res*, 42(Database issue):D490–D495.
42. Browning C, Shneider MM, Bowman VD, Schwarzer D, Leiman PG. 2012. Phage pierces the host cell membrane with the iron-loaded spike. *Structure (London, England : 1993)*, 20(2):326–339.
43. Garcia-Doval C, Caston JR, Luque D, Granell M, Otero JM, Llamas-Saiz AL, *et al.* 2015. Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped tail Fibre with and without its intra-molecular chaperone. *Viruses* 7:6424–6440.
44. Dunne M, Hupfeld M, Klumpp J, Loessner M. 2018. Molecular Basis of Bacterial Host Interactions by Gram-Positive Targeting Bacteriophages. *Viruses* 10:397.
45. Schulz EC, Dickmanns A, Urlaub H, Schmitt A, Muhlenhoff M, Stummeyer K, *et al.* 2010. Crystal structure of an intramolecular chaperone mediating triple-beta-helix folding. *Nat Struct Mol Biol* 17:210–215.
46. Adriaenssens E, Brister JR. 2017. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, 9(4):70.
47. Barchi Y, Philippe C, Chaïb A, Oviedo-Hernandez F, Claisse O, Le Marrec C. 2023. Phage

- encounters recorded in CRISPR arrays in the genus *Oenococcus*. *Viruses* 15(1):15.
48. Kupczok A, Neve H, Huang KD, Hoepfner MP, Heller KJ, Franz CMAP, Dagan T. 2018. Rates of mutation and recombination in Siphoviridae phage genome evolution over three decades. *Mol Biol Evol*, 35(5):1147–1159.
 49. Kodaira KI, Oki M, Kakikawa M, Watanabe N, Hirakawa M, Yamada K, Taketo A. 1997. Genome structure of the Lactobacillus temperate phage phi g1e: the whole genome sequence and the putative promoter/repressor system. *Gene*, 187(1):45–53.
 50. Leavitt JC, Gilcrease EB, Wilson K, Casjens SR. 2013. Function and horizontal transfer of the small terminase subunit of the tailed bacteriophage Sf6 DNA packaging nanomotor. *Virology*, 440(2):117– 133.
 51. Otreba M, Marek Ł, Tyczynska N, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Olczyk P, Rzepecka-Stojko, A. 2022. Propolis as natural product in the oral cavity bacterial infections treatment: a systematic review. *Appl. Sci.* 12:10123.
 52. Veloz JJ, Saavedra N, Alvear M, Zambrano T, Barrientos L, Salazar LA. 2016. Polyphenol-rich extract from propolis reduces the expression and activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases at subinhibitory concentrations. *BioMed Research International*, ID 4302706.
 53. Theodorou I, Courtin P, Sadovskaya I, *et al.* 2020. Three distinct glycosylation pathways are involved in the decoration of *Lactococcus lactis* cell wall glycopolymers. *J Biol Chem*, 295(16):5519-5532.
 54. Guérin H, Kulakauskas S, Chapot-Chartier MP. 2022. Structural variations and roles of rhamnose- rich cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *J Biol Chem*, 298(10):102488.
 55. Mahony J. 2021. Cell surface polysaccharides represent a common strategy for adsorption among phages infecting Lactic Acid Bacteria: lessons from dairy Lactococci and Streptococci. *mSystems* 6(4):e0064121.
 56. Barchi Y, Philippe C, Chaïb A, Oviedo-Hernandez F, Claisse O, Le Marrec C. 2023. Phage encounters recorded in CRISPR arrays in the genus *Oenococcus*. *Viruses* 15(1):15.
 57. De Paepe M, Hutinet G, Son O, Amarir-Bouhram J, Schbath S, Petit MA. 2014. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases. *PLoS Genet* 10(3):e1004181.
 58. Smug B, Szczepaniak K, Rocha EPC, Dunin-Horkawicz S, Mostowy RJ. 2022. Protein modularity in phages is extensive and associated with functions linked to core replication machinery and host tropism determinants. *bioRxiv* 521992.
 59. Endo A, Okada S. 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic- fermenting *Oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2345-2348.
 60. Kelley DS, Lennon CW, SEA-PHAGES, Belfort M, Novikova O. (2016). Mycobacteriophages as Incubators for Intein Dissemination and Evolution. *mBio*, 7(5) : e01537-16.
 61. Barchi Y, Chaïb A, Philippe C, Claisse O, Le Marrec, C. Draft genome sequence of

Oenococcus kitaharae CRBO2176, isolated from a home-made water kefir. Genome Announc., submitted.

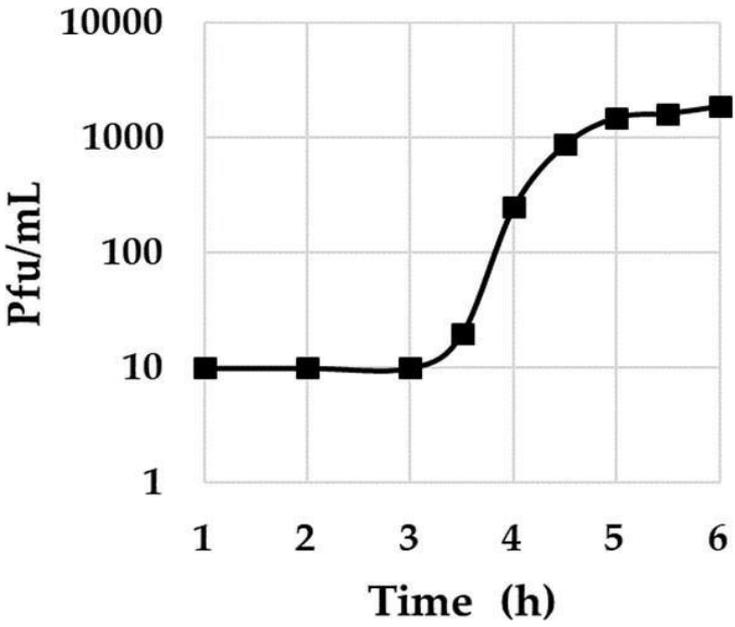
62. Caspritz G, Radler F. 1983. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *J. Biol Chem* 258(8):4907–4910.
63. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kuliko v AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455- 477.
64. Söding J, Biegert A, Lupas AN. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33:W244–W248.
65. Marchler-Bauer A, Bryant SH. 2004. CD-Search: Protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32:W327–W331.
66. Naville M, Ghuillot-Gaudeffroy A, Marchais A, Gautheret D. 2011. ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA biology*, 8(1):11–13.
67. Hallgren J, Tsirigos KD, Pedersen MD, Almagro Armenteros JJ, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O. 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv* 2022.04.08.487609; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
68. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva VA. 2018. Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core. *J Mol Biol* 430:2237–2243.
69. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66:486-501.
70. Hendrix SB, Soininen H, van Hees AMJ, *et al.* 2003. Alzheimer's Disease Composite Score: A Post- Hoc Analysis Using Data from the LipiDiDiet Trial in Prodromal Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 6:232-236.
71. Holm L. 2022. Dali server: structural unification of protein families, *Nuc Acids Res*, 50:W210–W215.
72. Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881–10890.
73. Gouet P, Robert X, Courcelle E. 2003. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 31:3320–3323.
74. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, *et al.* 2021. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 30:70–82.

Supplemental Figure



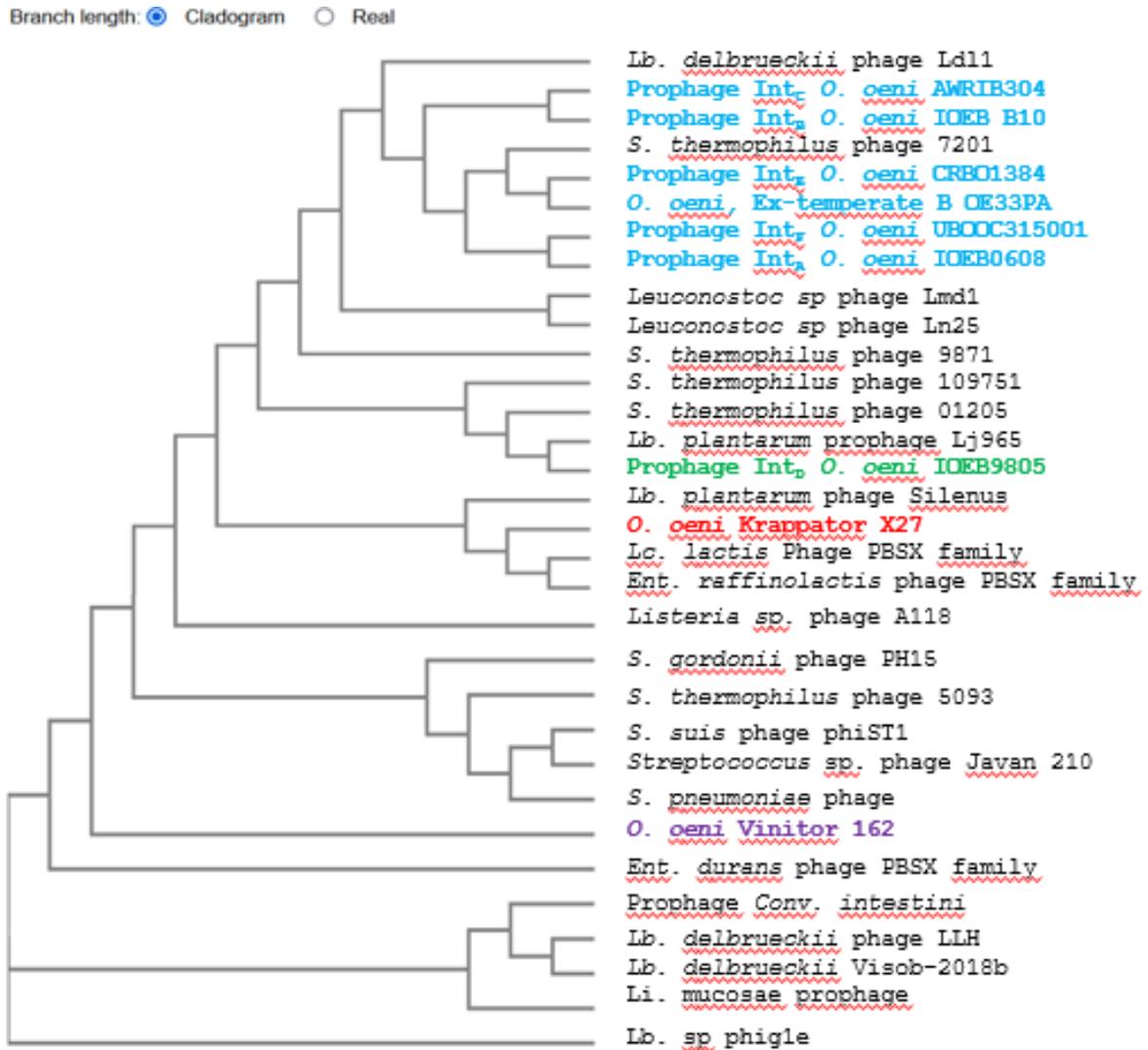
Growth curves in MRS broth for control (without bacteriophages) and with bacteriophages OE33PA (left) and X₂₇ (right) at different moi after 72 h incubation at 25°C. C, non-infected control culture.

Supplemental Figure



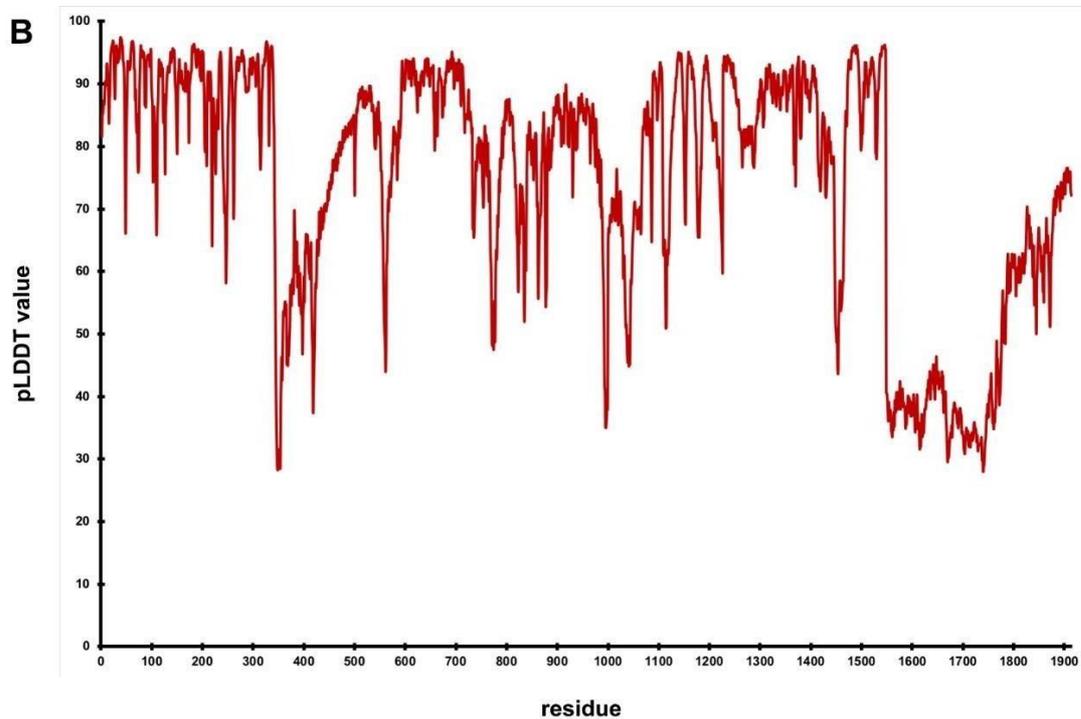
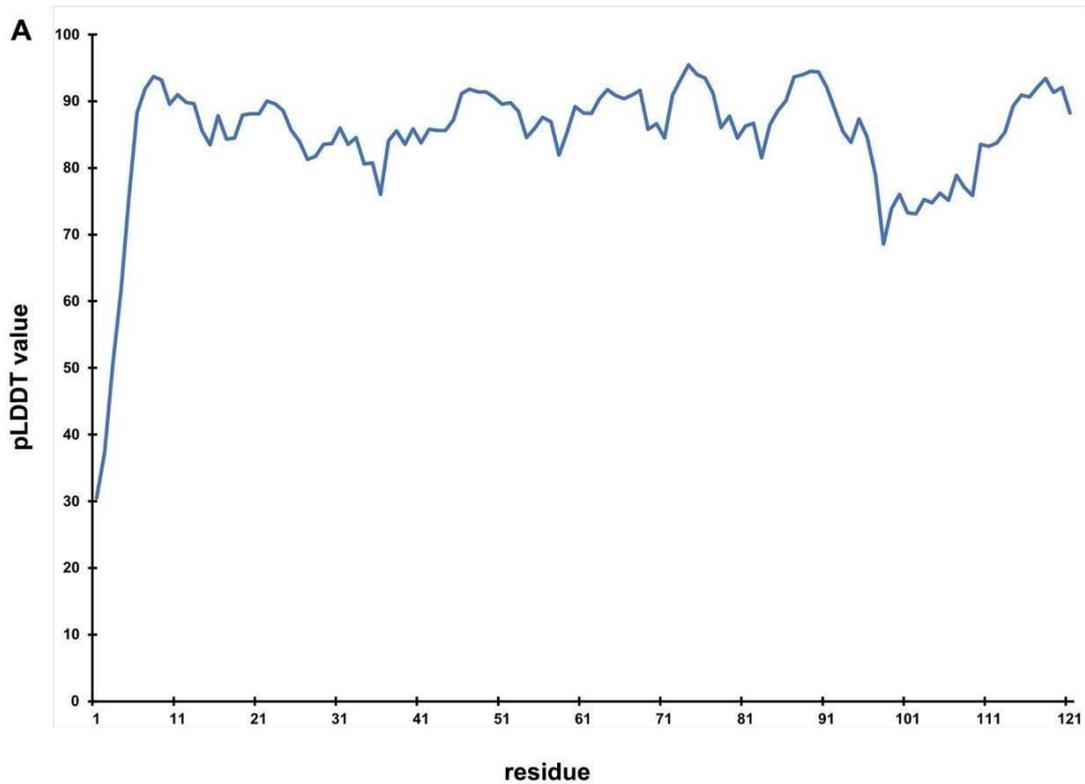
One-step growth curve experiment of phage X₂₇ in MRS broth

Supplemental Figure



ClustalW alignments of the TerL protein sequences of phages infecting lactic acid bacteria. The sequence from X₂₇ is in red and other oenophage groups are represented in blue, green and purple).

Supplementary Figure S170



Plots of pLDDT (predicted local distance difference test) values for structure predictions. A) pLDDT values for each residue along the X₂₇ Dit sequence are plotted. B) pLDDT values for each residue along the X₂₇ Tal sequence are plotted

Supplementary Figure

A

```
1      10      20      30      40      50      60
Dit_X27 MAAYLSINGTQVKSPOTLECI IQDIDAKADRDAOGLLHRDRVATKRKLTIKWGPLTVAE
Dit_X28 MAAYLSINGTQVKSPOTLECI IQDIDAKADRDAOGLLHRDRVATKRKLTIKWGPLTVAE
Dit_X149 MAAYLSINGTQVKSPOTLECI IQDIDAKADRDAOGLLHRDRVATKRKLTIKWGPLTVAE
consensus>50 MAAYLSINGTQVKSPOTLECI IQDIDAKADRDAOGLLHRDRVATKRKLTIKWGPLTVAE

70      80      90      100     110     120
Dit_X27 CSTILSAMSGQFFSCTYLDSQLGAMTTKTFYSGDRTPPYFTFNEALSAYVWQDLEVDFIEQ
Dit_X28 CSTILSAMSGQFFSCTYLDSQLGAMTTKTFYSGDRTPPYFTFNEALSAYVWQDLEVDFIEQ
Dit_X149 CSTILSAMSGQFFSCTYLDSQLGAMTTKTFYSGDRTPPYFTFNEALSAYVWQDLEVDFIEQ
consensus>50 CSTILSAMSGQFFSCTYLDSQLGAMTTKTFYSGDRTPPYFTFNEALSAYVWQDLEVDFIEQ
```

B

```

1       10       20       30       40       50       60
X27    MITQSASTTALWONSQRTLDKAVEIGTTEYGTDDITSISYDSGAFSGDTPFSIGSNYENSV
X28    MITQSASTTALWONSQRTLDKAVEIGTTEYGTDDITSISYDSGAFSGDTPFSIGSNYENSV
X149   MITQSASTTALWONSQRTLDKAVEIGTTEYGTDDITSISYDSGAFSGDTPFSIGSNYENSV
consensus>50 MITQSASTTALWONSQRTLDKAVEIGTTEYGTDDITSISYDSGAFSGDTPFSIGSNYENSV

70       80       90       100      110      120
X27    TIVFSHLVEGLTQGTKVTAKVGIKTADGTFDYTPPLGTFIISDDIEMDRNNDATTIKCYDQ
X28    TIVFSHLVEGLTQGTKVTAKVGIKTADGTFDYTPPLGTFIISDDIEMDRNNDATTIKCYDQ
X149   TIVFSHLVEGLTQGTKVTAKVGIKTADGTFDYTPPLGTFIISDDIEMDRNNDATTIKCYDQ
consensus>50 TIVFSHLVEGLTQGTKVTAKVGIKTADGTFDYTPPLGTFIISDDIEMDRNNDATTIKCYDQ

130      140      150      160      170      180
X27    MCLLEGTYTSKLTYPAKAVDVIAEIAIDMTGVILNSDDIARLPVLPDFASAITGQTYRDAL
X28    MCLLEGTYTSKLTYPAKAVDVIAEIAIDMTGVILNSDDIARLPVLPDFASAITGQTYRDAL
X149   MCLLEGTYTSKLTYPAKAVDVIAEIAIDMTGVILNSDDIARLPVLPDFASAITGQTYRDAL
consensus>50 MCLLEGTYTSKLTYPAKAVDVIAEIAIDMTGVILNSDDIARLPVLPDFASAITGQTYRDAL

190      200      210      220      230      240
X27    GWIAQFYACFALFDRNGELTFRTVTDVDYTIISPEGYLOGGLTKNEATYAIIGGIQCVTTT
X28    GWIAQFYACFALFDRNGELTFRTVTDVDYTIISPEGYLOGGLTKNEATYAIIGGIQCVTTT
X149   GWIAQFYACFALFDRNGELTFRTVTDVDYTIISPEGYLOGGLTKNEATYAIIGGIQCVTTT
consensus>50 GWIAQFYACFALFDRNGELTFRTVTDVDYTIISPEGYLOGGLTKNEATYAIIGGIQCVTTT

250      260      270      280      290      300
X27    TTDSTGDSVDNTVTLQAGSASCSQIAITNNLMTQAMLNAIWTKIEDINFPFTLNWFGNP
X28    TTDSTGDSVDNTVTLQAGSASCSQIAITNNLMTQAMLNAIWTKIEDINFPFTLNWFGNP
X149   TTDSTGDSVDNTVTLQAGSASCSQIAITNNLMTQAMLNAIWTKIEDINFPFTLNWFGNP
consensus>50 TTDSTGDSVDNTVTLQAGSASCSQIAITNNLMTQAMLNAIWTKIEDINFPFTLNWFGNP

310      320      330      340      350      360
X27    AIEAGDWLKLEDTOGNSFNVPNNSYTMVFDGSESTSSAEQSTSSDTSYTGNLQQTVD
X28    AIEAGDWLKLEDTOGNSFNVPNNSYTMVFDGSESTSSAEQSTSSDTSYTGNLQQTVD
X149   AIEAGDWLKLEDTOGNSFNVPNNSYTMVFDGSESTSSAEQSTSSDTSYTGNLQQTVD
consensus>50 AIEAGDWLKLEDTOGNSFNVPNNSYTMVFDGSESTSSAEQSTSSDTSYTGNLQQTVD

370      380      390      400      410      420
X27    SLFGLRDP TGNFIYGPDTTQEP TDAKFGDIWYKQNGNDVELWIIYQESDGTGKWWEDVDQ
X28    SLFGLRDP TGNFIYGPDTTQEP TDAKFGDIWYKQNGNDVELWIIYQESDGTGKWWEDVDQ
X149   SLFGLRDP TGNFIYGPDTTQEP TDAKFGDIWYKQNGNDVELWIIYQESDGTGKWWEDVDQ
consensus>50 SLFGLRDP TGNFIYGPDTTQEP TDAKFGDIWYKQNGNDVELWIIYQESDGTGKWWEDVDQ

430      440      450      460      470      480
X27    GFANRVSDSVDSAT TDMQSYADSQNSVSSAASSAAVVASNAYTTGSTAI !DASNAVNTA
X28    GFANRVSDSVDSAT TDMQSYADSQNSVSSAASSAAVVASNAYTTGSTAI !DASNAVNTA
X149   GFANRVSDSVSSAATDMQSYADSQNSVSSAASSAAVVASNAYTTGSTAI !DASNAVNTA
consensus>50 GFANRVSDSVdSAtTDMQSYADSQNSVSSAASSAAVVASNAYTTGSTAI !DASNAVNTA

490      500      510      520      530      540
X27    NSAAATKANTATASASTAITNASTAINTANNAANVASGANTAAVSATTTANSINDFVRDTN
X28    NSAAATKANTATASASTAITNASTAINTANNAANVASGANTAAVSATTTANSINDFVRDTN
X149   NSAAAT.....SASTAITNASTAINTANNAANVASGANTAAVSATTTANSINDFVRDTN
consensus>50 NSAAAtkantataSASTAITNASTAINTANNAANVASGANTAAVSATTTANSINDFVRDTN

550      560      570      580      590      600
X27    NNLSDDFQDALSRITILSGWNSGTSIRSQLSSELDDYVTTDQLNLLQIGGRNYILGTRKTS
X28    NNLSDDFQDALSRITILSGWNSGTSIRSQLSSELDDYVTTDQLNLLQIGGRNYILGTRKTS
X149   NNLSDDFQDALSRITILSGWNSGTSIRSQLSSELDDYVTTDQLNLLQIGGRNYILGTRKTS
consensus>50 NNLSDDFQDALSRITILSGWNSGTSIRSQLSSELDDYVTTDQLNLLQIGGRNYILGTRKTS

610      620      630      640      650      660
X27    ATLNNGNRQDFNPYDVSSALWQNIKVGDTVYVSVGWTTLATALSSSTLLVGFSTSPQON
X28    ATLNNGNRQDFNPYDVSSALWQNIKVGDTVYVSVGWTTLATALSSSTLLVGFSTSPQON
X149   ATLNNGNRQDFNPYDVSSALWQNIKVGDTVYVSVGWTTLATALSSSTLLVGFSTSPQON
consensus>50 ATLNNGNtQqDFnPY#VSSALWqN!kVgdtVYVSVGWTTLATALSSstLLVGFSTSPqQN

```

670 680 690 700 710 720
X27 VTASIPAGQTSGLSLPITISQAQITAAASPOILVRVPSLIVTGNSTITINQVKEIGTKAT
X28 VTASIPAGQTSGLSLPITISQAQITAAASPOILVRVPSLIVTGNSTITINQVKEIGTKAT
X149 VKAPIPAGQTSGLSLPITISQAQITAAASPOILVRVPSLIVTGNSTITINQVKEIGTKAT
consensus>50 VtAsIPAGQTSGLSLPITISQAQITAAASPOILVRV!pSlIvtGNSTITINQVKEIGTKAT

730 740 750 760 770 780
X27 DWS#APEDVASASDYTLVKQTADNITDFVHDSNGNISSTFMSAFLaTSLMEGIDGStSLK
X28 DWS#APEDVASASDYTLVKQTADNITDFVHDSNGNISSTFMSAFLaTSLMEGIDGStSLK
X149 DWS#APEDVASASDYTLVKQTADNITDFVHDSNGNISSTFMSAFLaTSLMEGIDGStSLK
consensus>50 DWS#APEDVASASDYTLVKQTADNITDFVHDSNGNISSTFMSAFLaTSLMEGIDGStSLK

790 800 810 820 830 840
X27 SQTSTMISTALEGPNGNISTLQQTVNGLTSTVSTLQTNVNNLQGNLIANSEFLPDLDGDW
X28 SQTSTMISTALEGPNGNISTLQQTVNGLTSTVSTLQTNVNNLQGNLIANSEFLPDLDGDW
X149 SQTSTMISTALEGPNGNISTLQQTVNGLTSTVSTLQTNVNNLQGNLIANSEFLPDLDGDW
consensus>50 SQTSTMISTALEGPNGNISTLQQTVNGLTSTVSTLQTNVNNLQGNLIANSEFLPDLDGDW

850 860 870 880 890 900
X27 FMGNPSSSFNSIPLDSHYGLAGGIQNGSHVLKRTVSGSNRLQSMASISIVPGSTNTFRINV
X28 FMGNPSSSFNSIPLDSHYGLAGGIQNGSHVLKRTVSGSNRLQSMASISIVPGSTNTFRINV
X149 FMGNPSSSFNSIPLDSHYGLAGGIQNGSHVLKRTVSGSNRLQSMASISIVPGSTNTFRINV
consensus>50 FMGNPSSSFNSIPLDSHYGLAGGIQNGSHVLKRTVSGSNRLQSMASISIVPGSTNTFRINV

910 920 930 940 950 960
X27 LVDANFDGdVSAGIYFFYFDLNKNFISNSFGmNITASNTTWQTGTISNVAPSNAAYVVVY
X28 LVDANFDGdVSAGIYFFYFDLNKNFISNSFGmNITASNTTWQTGTISNVAPSNAAYVVVY
X149 LVDANFDGdVSAGIYFFYFDLNKNFISNSFGmNITASNTTWQTGTISNVAPSNAAYVVVY
consensus>50 LVDANFDGdVSAGIYFFYFDLNKNFISNSFGmNITASNTTWQTGTISNVAPSNAAYVVVY

970 980 990 1000 1010 1020
X27 LADNGTTGAIYYNQPMEVTCSTIGGYIAGNYIGOTLTQTTAMSTINQNLTSITAFVTDGN
X28 LADNGTTGAIYYNQPMEVTCSTIGGYIAGNYIGOTLTQTTAMSTINQNLTSITAFVTDGN
X149 LADNGTTGAIYYNQPMEVTCSTIGGYIAGNYIGOTLTQTTAMSTINQNLTSITAFVTDGN
consensus>50 LADNGTTGAIYYNQPMEVTCSTIGGYIAGNYIGOTLTQTTAMSTINQNLTSITAFVTDGN

1030 1040 1050 1060 1070 1080
X27 GNVGTEFLTAFEKTSMLTGWGSSSIFQQTSSSITLALTNLQISSQOLLINSAFSTDFTN
X28 GNVGTEFLTAFEKTSMLTGWGSSSIFQQTSSSITLALTNLQISSQOLLINSAFSTDFTN
X149 GNVGTEFLTAFEKTSMLTGWGSSSIFQQTSSSITLALTNLQISSQOLLINSAFSTDFTN
consensus>50 GNVGTEFLTAFEKTSMLTGWGSSSIFQQTSSSITLALTNLQISSQOLLINSAFSTDFTN

1090 1100 1110 1120 1130 1140
X27 WTNEGTSWTIDSSNQLNGNNSVTTTIGSGHRLIQNLISASAYTPQLGDDYTVTFWAKAD
X28 WTNEGTSWTIDSSNQLNGNNSVTTTIGSGHRLIQNLISASAYTPQLGDDYTVTFWAKAD
X149 WTNEGTSWTIDSSNQLNGNNSVTTTIGSGHRLIQNLISASAYTPQLGDDYTVTFWAKAD
consensus>50 WTNEGTSWTIDSSNQLNGNNSVTTTIGSGHRLIQNLISASAYTPQLGDDYTVTFWAKAD

1150 1160 1170 1180 1190 1200
X27 STGAVLLMtlLGGaQpTFNLTTSWAQYSYTFKNMSSTFVGTPrFYFWSNVSGHQIWLNSP
X28 STGAVLLMtlLGGaQpTFNLTTSWAQYSYTFKNMSSTFVGTPrFYFWSNVSGHQIWLNSP
X149 STGAVLLMtlLGGaQpTFNLTTSWAQYSYTFKNMSSTFVGTPrFYFWSNVSGHQIWLNSP
consensus>50 STGAVLLMtlLGGaQpTFNLTTSWAQYSYTFKNMSSTFVGTPrFYFWSNVSGHQIWLNSP

1210 1220 1230 1240 1250 1260
X27 MVVKGDKAVSSWSLSQKEIATNVNLLPEINIQAQTLLIQNNKlYLNASSIVFGGTAFIND
X28 MVVKGDKAVSSWSLSQKEIATNVNLLPEINIQAQTLLIQNNKlYLNASSIVFGGTAFIND
X149 MVVKGDKAVSSWSLSQKEIATNVNLLPEINIQAQTLLIQNNKlYLNASSIVFGGTAFIND
consensus>50 MVVKGDKAVSSWSLSQKEIATNVNLLPEINIQAQTLLIQNNKlYLNASSIVFGGTAFIND

1270 1280 1290 1300 1310 1320
X27 AMVTDLSASKLTAGTIDASKITVINLDANNISANgATFFkTQWQSNYGQYLSITASEIDF
X28 AMVTDLSASKLTAGTIDASKITVINLDANNISANgATFFkTQWQSNYGQYLSITASEIDF
X149 AMVTDLSASKLTAGTIDASKITVINLDANNISANgATFFkTQWQSNYGQYLSITASEIDF
consensus>50 AMVTDLSASKLTAGTIDASKITVINLDANNISANgATFFkTQWQSNYGQYLSITASEIDF

1330 1340 1350 1360 1370 1380
X27 ITSSNTAKINS S GFTVYQGS GQFGFNVTKW G DSSGGTSSSYGYMGTYT S NGFLAFTGNG
X28 ITSSNTAKINS S GFTVYQGS GQFGFNVTKW G DSSGGTSSSYGYMGTYT S NGFLAFTGNG
X149 ITSSNTAKINS S GFTVYQGS GQFGFNVTKW G P A G G G T S S Y G Y M G T Y T S N G F L A F T G N G
consensus>50 ITSSNTAKINS S GFTVYQGS GQFGFNVTKW G D S S G G T S S Y G Y M G T Y T S N G F L A F T G N G

1390 1400 1410 1420 1430 1440
X27 I G S T L V W M D S G M S K G S Q V G E L G A W N F Y R D I L V A P D A S N V N Q S R Q L S F F G T N Y G I K A D N Q H
X28 I G S T L V W M D S G M S K G S Q V G E L G A W N F Y R D I L V A P D A S N V N Q S R Q L S F F G T N Y G I K A D N Q H
X149 I G S T L V W M D S G M D K G D S V G E L G A W N F Y R D V L A P D A S N V N Q S R Q L S F F G T N Y G I K A D N Q H
consensus>50 I G S T L V W M D S G M S K G S Q V G E L G A W N F Y R D I L V A P D A S N V N Q S R Q L S F F G T N Y G I K A D N Q H

1450 1460 1470 1480 1490 1500
X27 S S L N F Y T Q N H F W F S H K I V V N G S V A S A S L L S L K N I I G P M G A T E A I D D I L A T D I E K Y T F K D D
X28 S S L N F Y T Q N H F W F S H K I V V N G S V A S A S L L S L K N I I G P M G A T E A I D D I L A T D I E K Y T F K D D
X149 S S L N F Y T Q N H F W F S H K I V V N G S V A S A S L L S L K N I I G P M G A T E A I D D I L A T D I E K Y T F K D D
consensus>50 S S L N F Y T Q N H F W F S H K I V V N G S V A S A S L L S L K N I I G P M G A T E A I D D I L A T D I E K Y T F K D D

1510 1520 1530 1540 1550 1560
X27 P D A V T Q L S P I I D D V N A T P Q Y S I P A I I N N G D S V N I Y A M A S L S F L A I K Q L V A E L G D Y T I K G T
X28 P D A V T Q L S P I I D D V N A T P Q Y S I P A I I N N G D S V N I Y A M A S L S F L A I K Q L V A E L G D Y T I K G T
X149 P D A V T Q L S P I I D D V N T T P K Y S I P A I I N N G D S V N I Y A M A S L S F L A I K Q L V A E L G N Y A I K G T
consensus>50 P D A V T Q L S P I I D D V N A T P Q Y S I P A I I N N G D S V N I Y A M A S L S F L A I K Q L V A E L G # Y T I K G T

1570 1580 1590 1600 1610 1620
X27 T L L D G K N V K A N S M S V N S L D A N Y I A V N N G I L N L S S S D K T S V V Q I N S G S V L I Q O N T S A G V L D
X28 T L L D G K N V K A N S M S V N S L D A N Y I A V N N G I L N L S S S D K T S V V Q I N S G S V L I Q O N T S A G V L D
X149 T L L D G K N V K A N S M S V N S L D A N Y I A V N N G I L N L S S S D K T S V V Q I N S G S V L I Q O N T S A G V L D
consensus>50 T L L D G K N V K A N S M S V N S L D A N Y I A V N N G I L N L S S S D K T S V V Q I N S G S V L I Q O N T S A G V L D

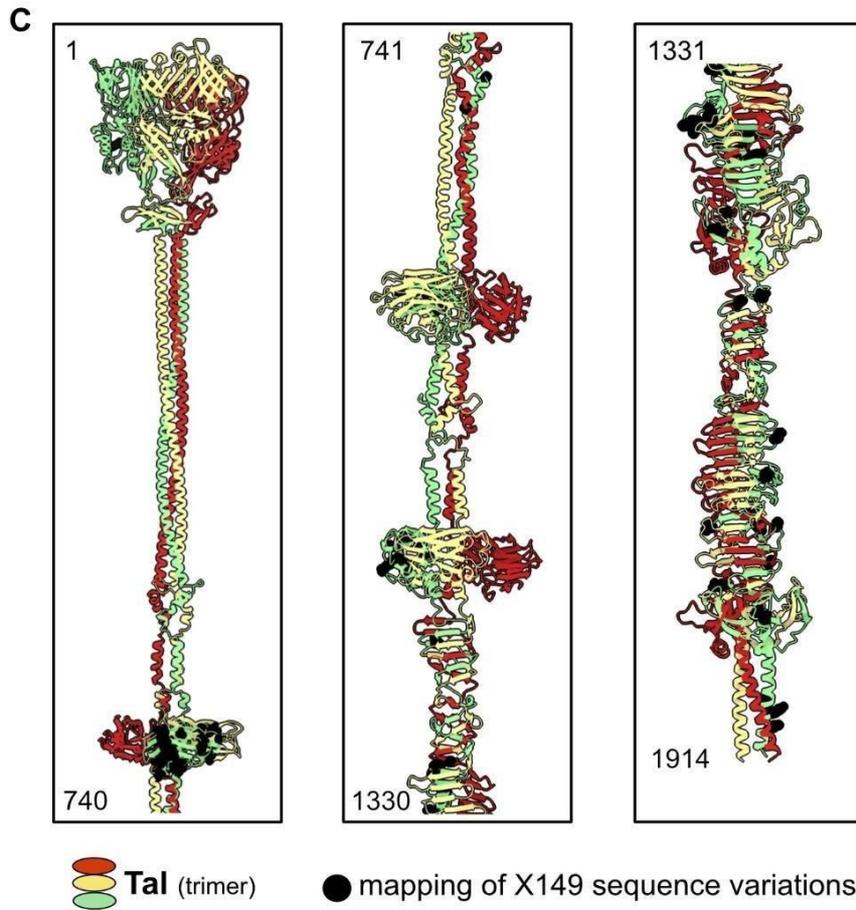
1630 1640 1650 1660 1670 1680
X27 G Q M L I N A Y S F S V F Y G S N L M T M E A D G I H M L D E N S L L Y T N I Y N G Y I E M S A T Q S S T Q A I S V G G
X28 G Q M L I N A Y S F S V F Y G S N L M T M E A D G I H M L D E N S L L Y T N I Y N G Y I E M S A T Q S S T Q A I S V G G
X149 G Q M L I N A Y S F S V F Y G S N L M T M E A D G I H M L D E K S L L Y T N I Y N G Y I E M S A T Q S S T Q A I S V G G
consensus>50 G Q M L I N A Y S F S V F Y G S N L M T M E A D G I H M L D E N S L L Y T N I Y N G Y I E M S A T Q S S T Q A I S V G G

1690 1700 1710 1720 1730 1740
X27 L I T T Y D S T N G G G V F L I A N T P G M G G T T H N S S S G N Y W N A A N V G L A Y R N S T T D E N S V G F A L R Y
X28 L I T T Y D S T N G G G V F L I A N T P G M G G T T H N S S S G N Y W N A A N V G L A Y R N S T T D E N S V G F A L R Y
X149 L I T T Y D S T N G G G V F L I A N T P G M G G T T H N S S S G N Y W N A A N V G L A Y R N S T T D E N S V G F A L R Y
consensus>50 L I T T Y D S T N G G G V F L I A N T P G M G G T T H N S S S G N Y W N A A N V G L A Y R N S T T # E N S V G F A L R Y

1750 1760 1770 1780 1790 1800
X27 N V T G Q T I Y I N S T D V V F S N S A G T G N G K I H F G T A G S A Y G I Q V D S T G A S M N F Y S S D H F Y F S K K
X28 N V T G Q T I Y I N S T D V V F S N S A G T G N G K I H F G T A G S A Y G I Q V D S T G A S M N F Y S S D H F Y F S K K
X149 N V T G Q T I Y I N S A D V V F S D S A G T G N G K I H F G T S G S A Y G I Q V D S T N A S M N F Y A S D H F Y F S K K
consensus>50 N V T G Q T I Y I N S T D V V F S # S A G T G N G K I H F G T A G S A Y G I Q V D S T G A S M N F Y S S D H F Y F S K K

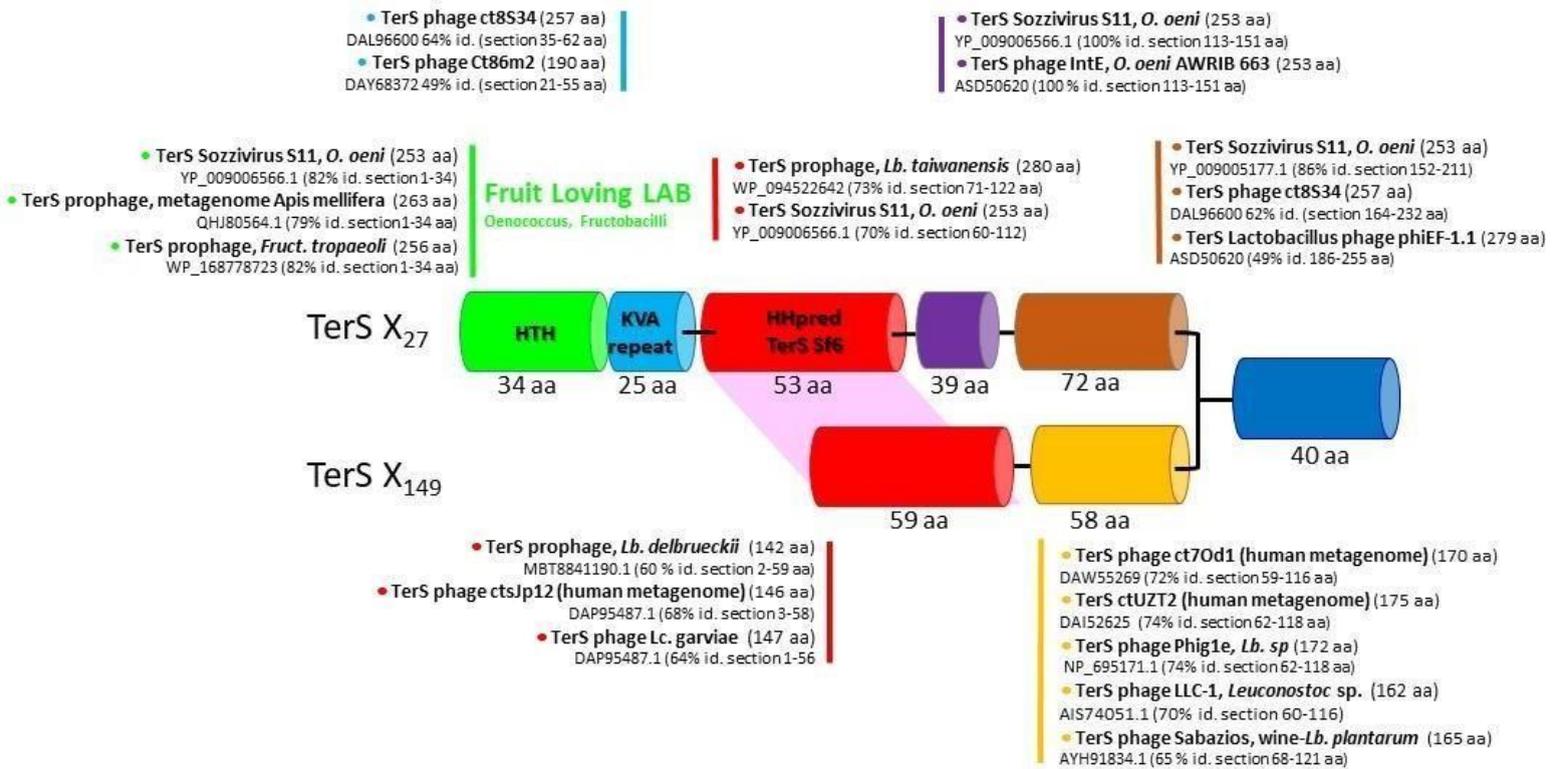
1810 1820 1830 1840 1850 1860
X27 I Q V V S T T Y T S L L S K K N V L G E Y K Y D A L N E I N K T D I R L I K F K S Q P N D K E H L T A I I D D V N E Q S
X28 I Q V V S T T Y T S L L S K K N V L G E Y K Y D A L N E I N K T D I R L I K F K S Q P N D K E H L T A I I D D V N E Q S
X149 I E V V S T T Y T S L L S K K N V L G E Y K Y D A L N E I N K T D I R L I K F K S Q P N D K E H L T A I I D D V N K Q S
consensus>50 I # V V S T T Y T S L L S K K N V L G E Y K Y D A L N E I N K T D I R L I K F K S Q P N D K E H L T A I I D D V N E Q S

1870 1880 1890 1900 1910
X27 K Y Y L P S I M K D D G G V D L Y S A V S L T F L A I K K E D S K V E K L K R V N E L E N Q V K M L Q S A
X28 K Y Y L P S I M K D D G G V D L Y S A V S L T F L A I K K E D S K V E K L K R V N E L E N Q V K M L Q S A
X149 Q Y Y L P S I M K D N G G V D L Y S A V S L T F L A I K K E D S K V E K L K R V A Q L E N T V K M L Q S A
consensus>50 K Y Y L P S I M K D # G G V D L Y S A V S L T F L A I K K E D S K V E K L K R V n # L E N q V K M L Q S A



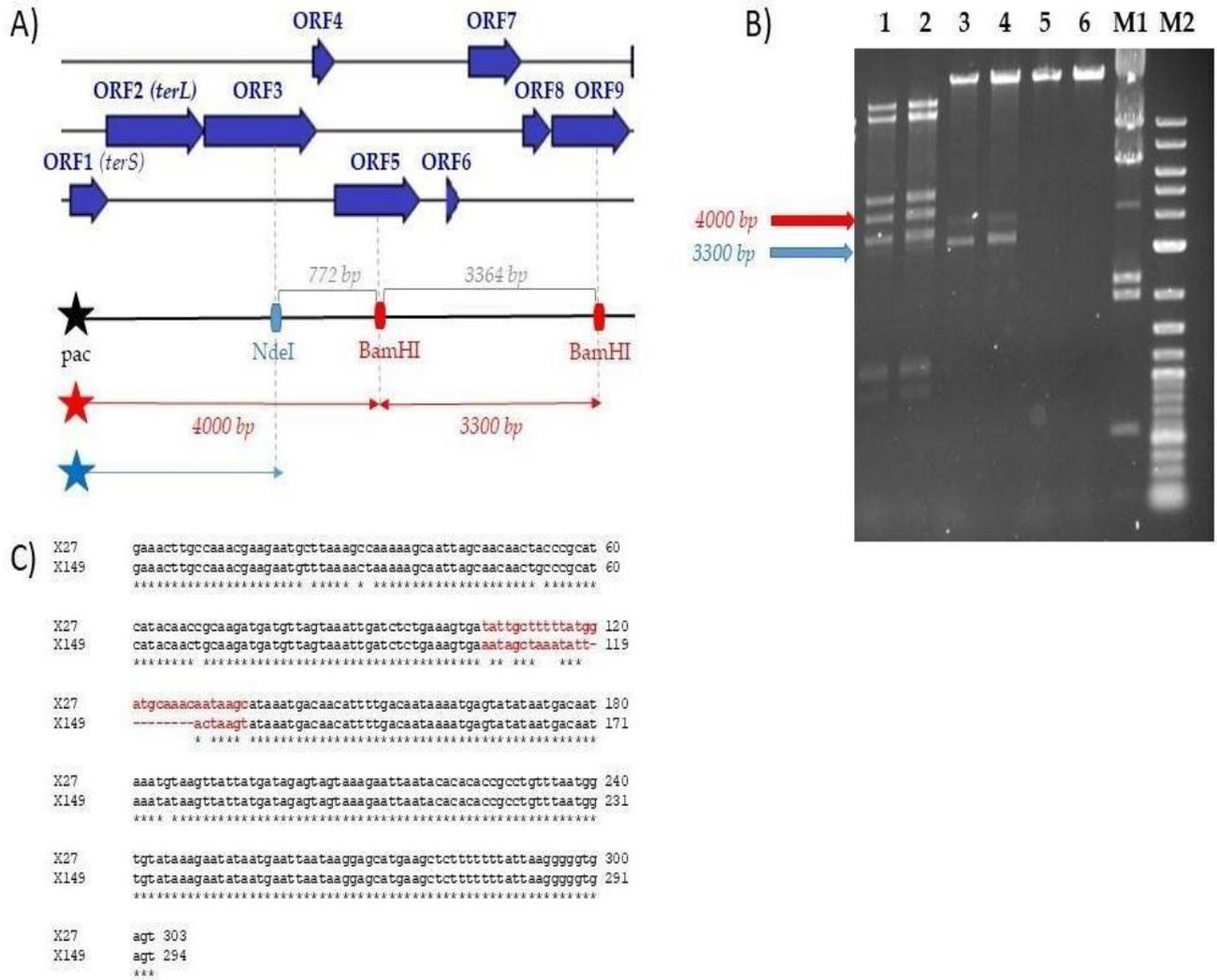
Krappator's Dit and Tal sequence alignment, and mapping of X₁₄₉ sequence variations. A) Multiple alignment of X₂₇, X₂₈ and X₁₄₉ Dit sequences. B) Multiple alignment of X₂₇, X₂₈ and X₁₄₉ Tal sequences. C) Mapping of X₁₄₉ Tal sequence variations on the X₂₇ Tal predicted structure.

Supplemental Figure S6



*****Chris Buck : ct8S34 is temperate and the corresponding lysogen belongs to *Leuconostoc mesenteroides* ssp. "sake"
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=70DJ8WNR016>. The metadata say it was feces from a one year-old baby in Russia.

Supplemental Figure S7



Localization of the *pac* site on the genome of *X*₁₄₉

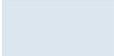
- Schematic view of the rightward region of the genome of *X*₁₄₉
- Electrophoresis of restriction digests of phage *X*₁₄₉ DNA. Lanes 1, 3, 5: digests of *X*₁₄₉ DNA with *NdeI*, *BamHI* and *BglIII*; Lanes 2, 4 and 6: phage DNA was heated before digestion with *NdeI*, *BamHI* and *BglIII*; M1, *HindIII*-digest of phage λ DNA; M2, 2-Log DNA ladder (Biolabs).
- Comparisons of the intergenic sequences upstream of *terS* in *X*₂₇ and *X*₁₄₉ showing a 30 bp divergent zone.

Table S1

X27	Query Length	Size (aa)	Predicted function	Best Blast Hit (or result from HHPRED analysis ^H)	Max Score	Query Cover %	E-value	Identity %	GenBank accession number
	Start, Stop, size (bp)								
61	41323-41463 (141 bp)	46	HP	ORFan					
60	40806-41330 (525 bp)	174	Phage Trans. Reg. (ArpU/RinA family)	Contains a TIGR01637 domain ^H			1.5e-13	26	
59	40573-40719 (147 bp)	48	HP	ORFan					
58*	40292-40576 (285 bp)	94	HP	ORFan					
57	39670-39999 (330 bp)	109	HP	ORFan					
56	39552-39644 (93 bp)	30	HP	orf 47 [Oenophage VbOeSunk162]	67,2	86	1,00E-10	80,8	ATE84875.1
55*	39103-39420 (318 bp)	105	HP	ORFan					
54	38707-39051 (345 bp)	114	YopX protein	YopX-like protein [Podoviridae phage ctf77; human metagenome]	44,3	92	9,00E-03	30,3	DAH24246.1
53	38549-38704 (156 bp)	51	HP	HP [prophage Intf; <i>O. oeni</i> UB00315005]	85,5	98	1,00E-20	82	WP_173807674.1
52*	38259-38552 (294 bp)	97	HP	HP [prophage IntA; <i>O. oeni</i> IOEB0501]	176	92	5,00E-55	93	KEP87905.1
51	37342-38202 (861 bp)	286	HP	orf 31 [Oenophage VbOeSunk162]	196	100	2,00E-58	56,7	ATE84859.1
				HP [Oenophage phiOE33PA]	122	99	6,00E-30	39,72	AWT48049.1
				HP [prophage <i>Lig. acidiphicis</i>]	68,2	98	4,00E-09	28,7	WP_079579067.1
50	37159-37332 (174 bp)	57	HP	ORFan					
49	36920-37159 (240 bp)	79	HP	ORFan					
48	36427-36801 (375 bp)	124	Homing HNH Endonuclease	NUMOD4 domain-containing HNH endonuclease [<i>Pa. mucilaginosus</i>]	86,3	87	3,00E-20	48,18	WP_014649263.1
				Homing HNH Endonuclease [Siphophage ctGxL44; human gut]	83,2	82	2,00E-19	45	DAN93683.1
47	36169-36330 (162 bp)	53	HP	ORFan					
46	35801-36172 (372 bp)	123	HP	ORFan					
45	35664-35804 (141 bp)	46	HP	ORFan					
44	35440-35664 (225 bp)	74	HP	ORFan					
43	35157-35378 (222 bp)	73	HP	ORFan					
42	34881-35147 (267 bp)	88	HP	HP MAQA_16041 [<i>List. aquatica</i> FSL 510-1188]	101	88	1,00E-25	61,54	EU116517.1
				Activating signal cointegrator [<i>Ent. faecalis</i> V5] ^H			6,70E-14	40	NP_814290.1
41	34336-34881 (546 bp)	181	HNH endonuclease	NinB-like HNH endonuclease orf29 [<i>Loct. plantarum</i> phage Satyr]	256	100	3,00E-84	68	YP_009797688.1
40	33674-33979 (306 bp)	101	HP	ORFan					
39	33114-33674 (561 bp)	186	Putative peptidase	HP [<i>Lac. lactis</i>]	102	97	1,00E-23	44,5	WP_212656484.1
				Tail needle protein [Salmonella phage P22] ^H			1.1e-8	11	
38	32420-33055 (636 bp)	211	HP	HP [prophage Intf; <i>O. oeni</i> AWRIB663]	219	88	8,00E-69	59,1	OIM23960.1
37	31599-32312 (714 bp)	237	HNH endonuclease	Endonuclease [Prophage ct8S34; <i>Leuc. mesenteroides</i> ; human gut]	115	75	4,00E-30	35,36	DAL96604.1
36	31351-31590 (240 bp)	79	HP	ORFan					
35*	30830-31183 (354 bp)	117	HP	HP [prophage Intf; <i>O. oeni</i> CRBO1384]	55,8	100	6,00E-07	30,8	WP_071439832.1
34	30311-30814 (504 bp)	167	HP	HP [prophage Intf; <i>O. oeni</i> UB00315005]	80,1	94	4,00E-15	31,5	WP_148124775.1
33	29419-30318 (900 bp)	299	Phage replisome organizer	Replication initiation protein [phage Javan271; <i>St. inae</i>]	191	51	1,00E-57	55,48	QBX16692.1
				conserved phage protein [<i>Liq. mali</i>]	197	63	9,00E-58	56,4	WP_003689665.1
32	28674-29432 (759 bp)	252	HNH endonuclease	HNH endonuclease [<i>Alkalibacterium thalassium</i>]	266	96	8,00E-86	49,4	WP_091264391.1
				HNH endonuclease [Myoviridae ct6H824; Human gut]	209	96	6,00E-66	44,53	DAF69007.1
31	27941-28369 (429 bp)	142	SSB protein	[<i>O. alcoholitolerans</i>]	158	79	7,00E-46	62	KGO32531
30	27678-27944 (267 bp)	88	HP	ORFan					
29*	26772-27668 (897 bp)	298	Endonuclease	PD-(D/E)XX nuclease-like domain containing protein [prophage Intf; <i>O. oeni</i> UB00315001]	271	97	1,00E-81	44,8	WP_148124771.1
28	25940-26821 (882 bp)	293	Recombinational DNA repair protein RecT (SSAP family)	recombinase RecT [prophage Intf; <i>O. oeni</i> UB00315005]	189	73	4,00E-55	47,22	SYW03913
				recombinase RecT [<i>Lc. lactis</i>]	167	75	5,00E-46	44	WP_058217316.1
				recombinase RecT [<i>St. hyointestinalis</i>]	166	97	5,00E-45	38,6	WP_164683499.1
27	25419-25763 (345 bp)	114	VRR-nuclease	Possible RecU-like resolvase [<i>Lb. helveticus</i>]	94,7	93	3,00E-22	42,6	WP_2200023566.1
26	24263-25354 (1092 bp)	364	Phage lysin	orf 24 [Oenophage VbOeSunk162]	460	99	8,00E-159	69,4	ATE84852.1
25	23912-24247 (336 bp)	112	HP	HP [prophage; <i>O. sicerae</i>]	356	98	3,00E-118	53,89	WP_128686739.1
24	23573-23836 (264 bp)	264	HP	ORFan					
23	23100-23504 (405 bp)	135	HP	ORFan					
22	22705-23103 (399 bp)	133	HP	ORFan					
21	22329-22577 (249 bp)	83	HP	HP LNA01_16630 [<i>Lb. nantensis</i>]	54,7	91	2,00E-06	32,03	GEO64480.1
20	21915-22328 (414 bp)	137	HP	HP [O. oeni]	99	87	4,00E-25	63,01	WP_071439673.1
				HP AWRIB304_1647 [O. oeni AWRIB304]	1420	69	0	68,15	EJN91653.1
				peptidase [prophage Intf; <i>O. oeni</i> IOEB_B10]	1419	69	0	68,07	KGH57015.1
19	16129-21873 (5745 bp)		Putative Tal	phage tail protein [O. oeni AWRIB1059]	1419	69	0	68,15	WP_080290169.1
18	15746-16111 (366 bp)	122	Dit	HP [O. oeni AWRIB663]	209	99	1,00E-67	77,69	WP_071437788.1
				HP [<i>Lb. ghanensis</i>]	198	97	3,00E-63	75,63	WP_057871071.1

17	10874-15730 (4587 bp)	1619	Tail length tape-measure protein	transglycosylase SLT domain-containing protein [<i>O. oeni</i> IOEBS13]	1773	99	0	63,01	WP_032811389.1
				conserved membrane HP [<i>O. oeni</i> CRB01308]	1772	99	0	62,91	SYW11815.1
				TMPHP [prophage <i>Liq. satsumensis</i>]	1027	100	0	49,6	WP_228889480
16	10500-10841 (342 bp)	113	HP	HP [prophage IntD phi9805, Sozzivirus; <i>O. oeni</i> IOEB9805]	131	81	1,00E-39	70,65	YP_009005191.1
				HP prophage LJ965 [<i>Lb. johnsonii</i>]	106	78	9,00E-30	57,3	NP_958592.1
15	10063-10461 (399 bp)	133	Tail assembly chaperone	HP [prophage IntD phi9805, Sozzivirus; <i>O. oeni</i> IOEB9805]	208	100	3,00E-69	76,69	YP_009005190.1
				HP prophage LJ965 [<i>Lb. johnsonii</i>]	136	96	1,00E-40	50	NP_958589.1
14	9523-9978 (456 bp)	152	Tail fiber	phage tail protein [<i>O. oeni</i> AWRIB1062]	240	99	5,00E-79	78,43	WP_071419542.1
13	9149-9517 (369 bp)	123	Tail completion protein	HP [prophage IntD phi9805, Sozzivirus; <i>O. oeni</i> IOEB9805]	176	91	8,00E-55	71,68	YP_009005188.1
				HP prophage LJ965 [<i>Lb. johnsonii</i>]	134	100	3,00E-40	48,36	NP_958591.1
				HP [<i>Lac. lactis</i> phage TP712]	92,4	99	1,00E-23	41,13	AAX13230.1
				Myoviridae CtfWc3	99	96	3,00E-26	40,34	DAF48802.1
12	8598-9149 (552 bp)	184	Possible neck protein	orf 23 [prophage IntD phiS13, Sozzivirus; IOEB SarcoS13]	286	100	2,00E-98	72,13	YP_009005243.1
				HK97 gp10 family phage protein [<i>O. sicerae</i>]	301	99	4,00E-102	75,96	WP_128686731.1
11	8246-8605 (360 bp)	119	Head closure knob	orf 22 [prophage IntD phiS13, Sozzivirus; IOEB SarcoS13]	183	99	7,00E-60	67,8	YP_009005242.1
				prophage protein [<i>Lb. ghanensis</i> DSM 18630]	137	90	2,00E-39	55,56	KRM06969.1
				prophage protein [<i>Lact. plantarum</i>]	136	85	5,00E-39	59,22	KRN34433.1
10	7944-8249 (306 bp)	102	Phage head-tail connector protein	HP [prophage; <i>Liq. satsumensis</i>]	154	98	3,00E-46	74	WP_054756753.1
				HP [<i>Lact. plantarum</i>]	150	98	5,00E-45	73	WP_057705085.1
				phage head-tail connector protein [<i>Lb. animalis</i>]	115	92	3,00E-31	60	WP_168731151.1
9	6886-7924 (1059 bp)	353	Major capsid protein	major capsid protein [<i>Lact. plantarum</i>]	488	99	2,00E-170	68,09	WP_057705086.1
				major capsid protein [prophage; <i>Liq. satsumensis</i>]	483	99	2,00E-168	68,75	WP_054756751.1
				MCP [prophage IntD phiS11, Sozzivirus; <i>O. oeni</i> IOEB SarcoS11]	481	100	5,00E-170	67,33	YP_0090056573.1
8	6476-6847 (372 bp)	124	Head decoration protein	HP [<i>O. sicerae</i>]	135	85	1,00E-38	73,58	WP_128686727.1
7	5736-6458 (723 bp)	241	Capsid/scaffold protein	DUF4355 domain-containing protein [<i>O. oeni</i> AWRIB663]	239	96	4,00E-76	60	WP_071437778.1
6	5446-5613 (168 bp)	56	HP	ORFan					
5	3916-5082 (1167 bp)	389	Head protein	minor capsid protein [<i>O. sicerae</i>]	581	99	0	70,62	WP_128686725.1
				minor capsid protein [prophage IntD, Sozzivirus; <i>O. oeni</i> IOEB SarcoS13]	561	99	0	69,41	WP_032811402.1
				phage head morphogenesis protein [prophage; <i>O. oeni</i> AWRIB714]	556	99	0	68,89	OIM37114.1
				minor capsid protein [prophage; <i>Liq. satsumensis</i>]	531	99	0	64,25	WP_054756172.1
				minor capsid protein [<i>Lact. plantarum</i>]	522	99	0	63,73	WP_057705092.1
4	3621-3914 (294 bp)	98	Cysteine Protease Prp	ribosomal-processing cysteine protease Prp [<i>O. oeni</i> , IntD prophage]	130	98	4,00E-37	61	WP_071437807.1
3	2156-3661 (1506 bp)	502	Portal protein	Portal protein Gp6 [prophage; <i>Liq. satsumensis</i> ; Shochu mash]	617	92	0	65,25	WP_054756736.1
				phage portal protein [prophage; <i>Lact. plantarum</i>]	607	92	0	64,82	WP_057705094.1
				phage portal protein [prophage; <i>O. oeni</i> CRB01308]	605	92	0	63,09	WP_071435963.1
2	827-2137 (1311 bp)	437	Terminase, large subunit	PBSX family phage terminase large subunit [<i>Ent. avium</i>]	663	97	0	73,6	WP_049222056.1
1	1-843 (843)	281	Terminase small subunit	Terminase small subunit [<i>O. sicerae</i>]	349	81	2,00E-118	79,22	WP_128686721.1
X149	Query Length	Size (aa)	Predicted function	Best matches	Max Score	Query Cover %	E-value	Identity %	enBank accession numbe
	Start, Stop, size (bp)								
58	40028-40474 (447 bp)	148	HP (DUF1642 domain)	orf 46 [Oenophage VbOeSunk162]	205	100	4,00E-65	66,9	ATE84874.1
55	38721-39152 (432 bp)	143	HP (HTH motif)	ORFan					
52	36533-37303 (771 bp)	256	Methylase	DNA modification methylase [<i>Fruct. lindneri</i>]	395	97	2,00E-136	73,6	SKA07868.1
35	28934-29206 (273bp)	90	HP	ORFan					
34	28546-28767 (222 bp)	73	Transc. Reg. (HTH motif)	Plant-associated <i>Arthrobacter</i> sp.	57,4	80	1,00E-08	48,33	TQK29788.1
29	25808-25915 (108 bp)	35	HP	ORFan					

Légende: *Oenococcus* (O); *Lactiplantibacillus* (Lact.); *Liquorilactibacilli* (Liq.); *Ligilactobacillus* (Lig.); *Fructilactobacillus* (Fruct.); *Enterococcus* (Ent.); *Lactobacillus* (Lb.); *Leuconostoc* (Leuc.); *Streptococcus* (St.); *Lactococcus* (Lact.); *Paenibacillus* (Pae.); *Listeria* (List.);

 genes specific to X27
 shuffled proteins

- Expériences complémentaires

Nous avons poursuivi la caractérisation des récepteurs de X₂₇ en isolant des mutants à partir de la souche BL4, dont la croissance est plus rapide que IOEB277. Une infection a été réalisée en milieu MRS, en présence d'une moi de 1 phage pour 300 bactéries. L'infection a mené à une lyse complète de la culture après 2-3 jours. A partir de 9 jours, un trouble a été de nouveau observé et un isolement a été réalisé à J+12. Le clone BL4-5 a été retenu. Il est résistant à l'infection par X₂₇ et l'adsorption du virus sur l'enveloppe de la cellule est fortement réduite. Ces observations suggèrent que BL4-5 est bien un BIM.

Le génome de ce clone a été séquencé et comparé à celui de la souche BL4 sauvage grâce au logiciel BreSeq. Deux mutations sont observées au sein d'une aminopeptidase (F52V), et d'une glycosyltransférase (déletion N-terminale) et deux autres mutations non-sens sont également identifiées dans deux protéines hypothétiques. Des travaux similaires menés chez *S. thermophilus* (*cos*) ont permis d'isoler des mutants BIMs résistants au phage DT1 qui n'avaient pas acquis de spacers. Leur analyse a permis d'identifier que la résistance était également liée à une mutation au sein d'une aminopeptidase (Labrie *et al.*, 2019). Il a été ultérieurement montré que la phylogénie des anti-récepteurs des phages de ce groupe est corrélée à un type de locus *eps* (Szymczak *et al.*, 2021).

D'autres mutants de la souche IOEBS277 sont en cours d'isolement au laboratoire et leur séquençage permettra d'infirmier ou de confirmer cette hypothèse.

Conclusion générale

Les bactéries du genre *Oenococcus* et leurs niches revisitées

L'espèce *O. oeni* a été initialement classée dans le genre *Leuconostoc* (comme *L. oenos*) et a longtemps représenté l'unique espèce du genre *Oenococcus*. De par son acidité (pH 3,0-4,0) et sa forte teneur en éthanol (9-16%), le vin représente la niche la plus inhospitalière pour *O. oeni*. Pourtant l'espèce est adaptée par excellence à ce milieu alors que les autres BL présentes aux étapes initiales de la vinification sont progressivement contre-sélectionnées. Le cidre est très vite apparu comme étant une seconde niche exploitable par cette espèce, et par une seconde espèce nommée *O. sicerae*. Le pH du cidre est légèrement plus élevé que celui du vin et il contient moins d'alcool (1,5-8%). Il est à noter que les oenocoques de l'espèce *oeni* sont abondants dans ces deux boissons fermentées emblématiques, et y jouent un rôle important en étant responsables de la FML.

Des approches métagénomiques ont récemment décrit la présence de *O. oeni* dans le thé fermenté, nommé kombucha, et également dans son vinaigre (Coton *et al.*, 2017 ; Leech *et al.* 2020). La forte prévalence des deux BL *O. oeni* et *Lb. nagelli* est observée, que le produit soit confectionné à partir de thé vert ou de thé noir (Coton *et al.*, 2017). Le kombucha a des caractéristiques moins difficiles que le vin et le cidre. Il expérimente également un pH de 3 au cours de sa fermentation mais ne contient que peu d'éthanol (0-1%) (Lorentzen *et al.*, 2019). La contribution de *O. oeni* aux qualités organoleptiques du kombucha reste à préciser. Elle est toutefois probable puisque les prévalences sont estimées à plus de 72% et à 24,5% dans le kombucha (Coton *et al.*, 2017 ; Leech *et al.* 2020) et à 52,5% dans le vinaigre de kombucha (Leech *et al.* 2020). Quelques souches ont été isolées par l'équipe de Emmanuel Coton à Brest et montrent une faible diversité génétique. En conformité avec les travaux déjà publiés, notre étude a bien conduit à l'isolement de souches de *O. oeni* et de *Lb. nagelli* à partir d'un échantillon de kombucha. Le décryptage du génome des souches *O. oeni* BL4, BL12, BL20 et BL29 montre que les souches s'organisent en un groupe génétique qui est distinct de celui formé par les souches brestoises. Notre étude prévoyait de tester plusieurs sources de kombucha, mais les échantillons ont été perdus suite à la fermeture du laboratoire pendant la pandémie.

Les souches d'oenocoques présentes dans le vin et le cidre proviennent de la surface des raisins et des pommes, ainsi que celle des matériels des chais. Plusieurs cas d'isolement

sporadique d'oenocoques à partir d'autres fruits comme les fruits à coques ont été également rapportés, sans toutefois que les souches ne soient versées à des collections ou encore séquencées. Il est donc vraisemblable que les surfaces des fruits, légumes et autres végétaux abritent naturellement des oenocoques parmi la multitude de BL présentes. Ceci est confirmé par la détection récente de souches dans les kéfirs d'eau (*O. sicerae* et *O. kitaharae*) et dans des enceintes de production de bioéthanol à partir de canne à sucre (*O. alcoholitorans*) (Lorentzen et Lucas, 2019 ; Verce et al., 2019 ; Leech et al. 2020). Dans notre étude, nous avons analysé un échantillon de kéfir d'eau de figues et isolé avec succès la souche *O. kitaharae* CRBO2176. Il est probable que l'engouement actuel pour les boissons de type kéfir-kombucha et pour les lactofermentations conduira à la multiplication des inventaires, à l'identification de nouveaux habitats pour les oenocoques et à la description de nouvelles espèces. A titre d'exemple, le génome d'une souche nommée *O. pseudo-oeni* isolée à partir de cidre a été déposé récemment dans Genbank et son analyse suggère qu'il pourrait correspondre à une nouvelle espèce. Un autre exemple est la détection de traces de *O. oeni* dans des graines de moutarde saumurée et de *O. kitaharae* dans des eaux de moulins oléicoles. Le séquençage de nouveaux génomes pourra également permettre de mieux comprendre les fonctions qui sont associées aux capacités d'adaptation dans les différentes niches.

L'isolement, le typage et l'identification d'oenocoques autochtones à partir des fruits/légumes semblent aisés. Toutefois, l'approche culturale peut être limitée par la croissance lente de ces bactéries par rapport aux autres entités présentes, et leur possible représentation minoritaire dans l'écosystème à ce stade. Une incubation prolongée des milieux inoculés est donc à recommander. Une difficulté supplémentaire est probablement liée également à la présence des bactéries à l'état adhérent sur les fruits, et à leur aptitude variable à effectuer une transition vers un état planctonique. Le degré de maturité des fruits et leur éventuel pressage apportent quant à eux des modifications dans la composition chimique (sucres, acides organiques, composés polyphénoliques) et l'Aw du milieu, qui ont également un impact sur le protocole à mettre en œuvre et le succès de l'isolement.

Les différents travaux menés de façon concomitante par plusieurs équipes montrent que certaines espèces comportent des membres capables d'évoluer dans une gamme large d'environnements : *O. oeni* (vin, cidre, kombucha, olives, moutarde), *O. kitaharae* (Shochu

japonais ; kéfirs d'eau) (Endo et Okada, 2006; Borneman *et al.*, 2012), *O. sicerae* (cidre et kéfirs). De la même façon, la synthèse des travaux menés montre que le cidre est la matrice où les différentes espèces décrites peuvent toutes se développer. Leur cohabitation rendrait possible des échanges de gènes.

Des connections entre oenocoques *via* leurs phages

Le second objectif de notre travail était d'évaluer si les oenocoques sont connectés *via* leurs phages. Nous avons d'abord testé la possibilité d'infections croisées entre phages et bactéries en considérant des espèces et des niches différentes. Malgré un nombre réduit de couples disponibles, nos expériences ont montré au sein de l'espèce *O. oeni* que des phages issus de vins pouvaient infecter des souches de cidre et de kombucha. La réciproque a été démontrée entre un phage de cidre et une souche de vin. La seconde approche a été d'explorer les loci CRISPR dans le genre *Oenococcus*. L'inventaire réalisé a permis d'identifier la présence de systèmes chez *O. sicerae* (cidre) et *O. kitaharae* (Shochu). De façon surprenante, les deux souches issues de kéfirs appartenant à ces deux espèces, ne disposent pas de CRISPR, et ont vraisemblablement perdu le locus. La même perte est observée chez *O. oeni* et concerne toutes les souches séquencées à ce jour. L'adaptation à certaines niches se traduirait donc par la perte de CRISPR. Ceci devra être conforté sur un panel de souches plus important. L'analyse du contenu en spacers montre que *O. kitaharae* et *O. sicerae* dans leur environnement respectif (fermentation de Shochu et de cidre) ciblent de multiples éléments mobiles, dont des phages. Toutefois ces derniers sont dans leur grande majorité distincts des oenophages connus dans la sphère oenologique, et ne présentent pas non plus d'homologie avec les génomes phagiques répertoriés dans les banques. Seuls quelques spacers présents chez *O. kitaharae* et *O. sicerae* pourraient témoigner d'infections récentes et anciennes par des phages présentant des homologies avec les oenophages des clusters I.1 et II.2. Il est possible que des phages contemporains des trois espèces aient une même histoire évolutive et dérivent d'un même ancêtre.

La présence d'un prophage chez *O. sicerae* UCMA15228 et son maintien en présence d'un mécanisme CRISPR nous ont amené à proposer l'existence de mécanismes anti-CRISPR chez la bactérie. Par ailleurs, devant les quelques éléments permettant de penser à des échanges possibles entre *O. oeni* et *O. sicerae*, nous avons comparé le génome du prophage présent chez *O. sicerae* et celui des oenophages. Nous avons ainsi observé que les protéines déduites

du module de morphogénèse présentait de fortes identités avec les protéines correspondantes des oenophages des groupes Int_D (tempérés) et Krappator (virulents). Les phages sont connus pour s'échanger des modules, par recombinaison homologue, recombinaison illégitime ou *via* l'intervention de transposases. De façon intéressante, le module conservé comporte les déterminants potentiellement impliqués dans la structure de la capsidie mais ne comporte pas la protéine Tal, qui est constitutive de l'extrémité de la queue et interagit avec l'enveloppe bactérienne.

Vers une meilleure compréhension de l'adsorption des oenophages sur l'enveloppe bactérienne.

L'étude des structures anti-récepteur phagique/récepteur bactérien a fait l'objet du chapitre 3 et nous avons choisi comme modèle d'étude le couple *O. oeni* IOEBS77/Krappator. Deux phages de ce groupe ont été isolés à partir de vins rouges de Merlot (Philippe *et al.*, 2017) et le décryptage de leur génome suggère qu'il s'agit de deux espèces d'un nouveau genre de phages virulents, en accord avec les modalités de classification établies par l'ICTV (Turner *et al.*, 2021; White *et al.*, 2022). Grâce à une collaboration avec l'équipe du LISM à Marseille (Christian Cambillau, Adeline Goulet, CNRS-AMU), la prédiction de la structure du dispositif d'adhésion du phage à l'hôte a été obtenue à l'aide du logiciel d'AlphaFold2. L'analyse révèle une machinerie multi-domaines allongée à l'extrémité de la queue, contenant des modules de liaison aux glucides probablement impliqués dans la reconnaissance et la liaison de l'hôte.

En complément de ce travail, la méthodologie de sélection de mutants résistants aux phages X₂₇ (BIM) a été mise en place au laboratoire. Nous avons utilisé la souche *O. oeni* BL4 issue de kombucha pour sa croissance plus rapide que celles du vin. Un premier mutant insensible au phage et ayant perdu la capacité à adhérer les particules virales a été sélectionné et le séquençage de son génome donne des pistes intéressantes quant à la nature du récepteur bactérien. Des expériences similaires sont en cours en présence d'autres phages, dont l'extrémité des parties caudales est différente de celle du phage X₂₇. Une meilleure compréhension des structures gouvernant l'adhésion des virus à leur hôte permettra de mieux comprendre l'impact de la matrice vin sur l'étape initiale du processus infectieux et notamment l'effet des composés polyphénoliques. La composition des vins pourrait moduler l'attaque des phages sur les bactéries et serait une variable supplémentaire dans le déroulement de la FML.

Conclusion générale

Ces travaux avaient pour objectif de mieux comprendre la biologie des oenocoques en renseignant sur leurs habitats et les facteurs qui conduisent à la coexistence d'espèces au sein des communautés explorées. Notre stratégie était d'obtenir des informations *via* l'étude des interactions entre bactéries et phages et des processus de co-évolution entre les deux entités dans les boissons fermentées.

Au travers des expériences et des résultats présentés, nous avons pu montrer l'existence de connections entre les différentes espèces *via* leurs phages. La diversité de ces phages reste à caractériser. Ainsi, deux groupes de phages, dont les phages Krappator, possèdent une recombinase de type RecT. Sa présence pourrait permettre la recombinaison entre des régions dissimilaires présentes sur des phages différents. Le mécanisme pourrait être un facteur expliquant la modularité des génomes d'oenophages et les échanges de sections observés. Ces phages contiennent également des itrons et/ou des intéines qui compliquent l'annotation des génomes et des expériences visant à vérifier si un épissage a lieu seront prochainement menées.

L'influence des oenophages sur les communautés bactériennes nécessitera également d'estimer le potentiel transducteur des particules virales et de caractériser également les mécanismes de résistance aux phages chez les oenocoques. Enfin, l'étude de la production de vésicules membranaires permettrait également de mieux comprendre les interactions des oenocoques avec le microbiote associé aux boissons fermentées.

Références bibliographiques

- Abedon, S.T., Murray, K.L., 2013. Archaeal Viruses, Not Archaeal Phages: An Archaeological Dig. *Archaea* 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/251245>
- Abouloifa, H., Hasnaoui, I., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., Abousalham, A., Jaouadi, B., Saalaoui, E., Asehrou, A., 2022. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 33–77. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2022.07.001>
- Adriaenssens, E.M., 2021. Phage Diversity in the Human Gut Microbiome: a Taxonomist's Perspective. *mSystems* 6, e00799-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00799-21>
- Aframian, N., Omer Bendori, S., Kabel, S., Guler, P., Stokar-Avihail, A., Manor, E., Msaeed, K., Lipsman, V., Grinberg, I., Mahagna, A., Eldar, A., 2022. Dormant phages communicate via arbitrium to control exit from lysogeny. *Nat. Microbiol.* 7, 145–153. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01008-5>
- Akhter, S., Aziz, R.K., Edwards, R.A., 2012. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies. *Nucleic Acids Res.* 40, e126–e126. <https://doi.org/10.1093/nar/gks406>
- Aksyuk, A.A., Rossmann, M.G., 2011. Bacteriophage Assembly. *Viruses* 3, 172–203. <https://doi.org/10.3390/v3030172>
- Alawamleh, A., Đurović, G., Maddalena, G., Guzzon, R., Ganassi, S., Hashmi, M.M., Wäckers, F., Anfora, G., Cristofaro, A.D., 2021. Selection of Lactic Acid Bacteria Species and Strains for Efficient Trapping of *Drosophila suzukii*. *Insects* 12, 153. <https://doi.org/10.3390/insects12020153>
- Almeida, O.G.G., Pinto, U.M., Matos, C.B., Frazilio, D.A., Braga, V.F., von Zeska-Kress, M.R., De Martinis, E.C.P., 2020. Does Quorum Sensing play a role in microbial shifts along spontaneous fermentation of cocoa beans? An in silico perspective. *Food Res. Int.* 131, 109034. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109034>
- Al-Shayeb, B., Sachdeva, R., Chen, L.-X., Ward, F., Munk, P., Devoto, A., Castelle, C.J., Olm, M.R., Bouma-Gregson, K., Amano, Y., He, C., Méheust, R., Brooks, B., Thomas, A., Lavy, A., Matheus-Carnevali, P., Sun, C., Goltsman, D.S.A., Borton, M.A., Sharrar, A., Jaffe, A.L., Nelson, T.C., Kantor, R., Keren, R., Lane, K.R., Farag, I.F., Lei, S., Finstad, K., Amundson, R., Anantharaman, K., Zhou, J., Probst, A.J., Power, M.E., Tringe, S.G., Li, W.-J., Wrighton, K., Harrison, S., Morowitz, M., Relman, D.A., Doudna, J.A., Lehours, A.-C., Warren, L., Cate, J.H.D., Santini, J.M., Banfield, J.F., 2020. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems. *Nature* 578, 425–431. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2007-4>
- Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K., Hayashi, T., 2009. The Defective Prophage Pool of *Escherichia coli* O157: Prophage–Prophage Interactions Potentiate Horizontal Transfer of Virulence Determinants. *PLoS Pathog.* 5, e1000408. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000408>
- Athukoralage, J.S., White, M.F., 2021. Cyclic oligoadenylate signaling and regulation by ring nucleases during typeIII CRISPR defense. *RNA* 27, 855–867. <https://doi.org/10.1261/rna.078739.121>
- Augustyniak, D., Olszak, T., Drulis-Kawa, Z., 2022. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of *Pseudomonas aeruginosa* Provide Passive Resistance but Not Sensitization to LPS-Specific Phages. *Viruses* 14, 121. <https://doi.org/10.3390/v14010121>
- Avrani, S., Schwartz, D.A., Lindell, D., 2012. Virus-host swinging party in the oceans: Incorporating biological complexity into paradigms of antagonistic coexistence. *Mob. Genet. Elem.* 2, 88–95.

<https://doi.org/10.4161/mge.20031>

- Badotti, F., Moreira, A.P.B., Tonon, L.A.C., de Lucena, B.T.L., Gomes, F. de C.O., Kruger, R., Thompson, C.C., de Morais, M.A., Rosa, C.A., Thompson, F.L., 2014. *Oenococcus* alcoholitolerans sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 1259–1267. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0296-z>
- Ball, C.A., Johnson, R.C., 1991. Efficient excision of phage lambda from the *Escherichia coli* chromosome requires the Fis protein. *J. Bacteriol.* 173, 4027–4031. <https://doi.org/10.1128/jb.173.13.4027-4031.1991>
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Kouba, M., Durjava, M.F., López-Alonso, M., López Puente, S., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R.E., Woutersen, R., Cocconcelli, P.S., Glandorf, B., Herman, L., Prieto Maradona, M., Saarela, M., Dierick, N., Martelli, G., Brantom, P., Tosti, L., Svensson, K., Anguita, M., Galobart, J., Innocenti, M., Pettenati, E., Revez, J., Brozzi, R., 2021. Safety and efficacy of a feed additive consisting on the bacteriophages PCM F/00069, PCM F/00070, PCM F/00071 and PCM F/00097 infecting *Salmonella Gallinarum* B/00111 (Bafasal®) for all avian species (Proteon Pharmaceuticals S.A.). *EFSA J.*
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., Tabanelli, G., 2019. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods* 8, 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Bartle, L., Sumby, K., Sundstrom, J., Jiranek, V., 2019. The microbial challenge of winemaking: yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Res.* 19, foz040. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz040>
- Bartowsky, E.J., 2017. *Oenococcus oeni* and the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S84–S94. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux034>
- Bartowsky, E.J., 2005a. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 174–187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x>
- Bartowsky, E.J., Costello, P.J., Chambers, P.J., 2015. Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 663–669. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12185>
- Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloglou, N., Matalas, A.-L., 2017. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutr. Res. Rev.* 30, 1–24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>
- Basso, J.T.R., Ankrah, N.Y.D., Tuttle, M.J., Grossman, A.S., Sandaa, R.-A., Buchan, A., 2020. Genetically similar temperate phages form coalitions with their shared host that lead to niche-specific fitness effects. *ISME J.* 14, 1688–1700. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0637-z>
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2016. Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Front. Microbiol.* 7, 613.
- Bech-Terkilsen, S., Westman, J.O., Swiegers, J.H., Siegumfeldt, H., 2020. *Oenococcus oeni*, a species born and moulded in wine: a critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses. *Aust. J. Grape Wine Res.* 26, 188–206. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12436>
- Bello, S., Rudra, B., Gupta, R.S., 2022. Phylogenomic and comparative genomic analyses of Leuconostocaceae species: identification of molecular signatures specific for the genera *Leuconostoc*, *Fructobacillus* and *Oenococcus* and proposal for a novel genus *Periweissella* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005284>
- Bernheim, A., Millman, A., Ofir, G., Meitav, G., Avraham, C., Shomar, H., Rosenberg, M.M., Tal, N., Melamed, S., Amitai, G., Sorek, R., 2021. Prokaryotic viperins produce diverse antiviral molecules. *Nature* 589,

120–124. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2762-2>

- Bernheim, A., Sorek, R., 2020. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>
- Betteridge, A., Grbin, P., Jiranek, V., 2015. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* 33, 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.008>
- Bidan, P., 1956. Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique. *Ann Tech Agric* 5, 597.
- Billaud, M., 2021. Les bactériophages : des alliés dans le combat contre l'antibiorésistance (These de doctorat). université Paris-Saclay.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M.E., Tremblay, A., Ouwehand, A.C., 2020. Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front. Microbiol.* 11, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Blanco-Picazo, P., Gómez-Gómez, C., Morales-Cortes, S., Muniesa, M., Rodríguez-Rubio, L., 2022a. Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a nut-based milk. *Int. J. Food Microbiol.* 367, 109590. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590>
- Bon, E., Delaherche, A., Bihère, E., Daruvar, A.D., Lonvaud-Funel, A., Marrec, C.L., 2009. *Oenococcus oeni* Genome Plasticity Is Associated with Fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2079–2090. <https://doi.org/10.1128/AEM.02194-08>
- Borneman, A.R., McCarthy, J.M., Chambers, P.J., Bartowsky, E.J., 2012. Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics* 13, 373. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-373>
- Brexó, R.P., de Souza Sant’Ana, A., 2018. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 231–244. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1332570>
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F., 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017–1032.
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.-P., Miller, S., Volckaert, G., Lavigne, R., 2014. Engineered Endolysin-Based “Artilynsins” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio* 5, e01379-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01379-14>
- Burns, N., James, C.E., Harrison, E., 2015. Polylysogeny magnifies competitiveness of a bacterial pathogen in vivo. *Evol. Appl.* 8, 346–351. <https://doi.org/10.1111/eva.12243>
- Campbell, A., 2003. The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Campbell-Sills, H., El Khoury, M., Favier, M., Romano, A., Biasioli, F., Spano, G., Sherman, D.J., Bouchez, O., Coton, E., Coton, M., Okada, S., Tanaka, N., Dols-Lafargue, M., Lucas, P.M., 2015. Phylogenomic Analysis of *Oenococcus oeni* Reveals Specific Domestication of Strains to Cider and Wines. *Genome Biol. Evol.* 7, 1506–1518. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv084>
- Campbell-Sills, H., El Khoury, M., Gammacurta, M., Miot-Sertier, C., Dutilh, L., Vestner, J., Capozzi, V., Sherman, D.J., Hubert, C., Claisse, O., 2017. Two different *Oenococcus oeni* lineages are associated to either red or white wines in Burgundy: genomics and metabolomics insights. *OENO One* 51, 309–322.

- Canon, F., Maillard, M.-B., Famelart, M.-H., Thierry, A., Gagnaire, V., 2022. Mixed dairy and plant-based yogurt alternatives: Improving their physical and sensorial properties through formulation and lactic acid bacteria cocultures. *Curr. Res. Food Sci.* 5, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.03.011>
- Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., Gagnaire, V., 2020a. Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures. *Front. Microbiol.* 11, 2088. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>
- Carvalhoes, F.G., Andrade, L.A. de, 2020. *Fermentação à brasileira: Explore o universo dos fermentados com receitas e ingredientes nacionais*. Editora Melhoramentos.
- Cenens, W., Makumi, A., Govers, S.K., Lavigne, R., Aertsen, A., 2015. Viral Transmission Dynamics at Single-Cell Resolution Reveal Transiently Immune Subpopulations Caused by a Carrier State Association. *PLOS Genet.* 11, e1005770. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005770>
- Cerutti, F., Cravero, D., Costantini, A., Pulcini, L., Modesto, P., Acutis, P.L., Vaudano, E., Peletto, S., 2019. Impact of DNA purification method and primer selection on 16S rRNA gene metabarcoding on wine. *OENO One* 53. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.3.2368>
- Chaïb, A., 2021. *La lysogénie dans l'espèce *Oenococcus oeni* : incidence et impacts sur la performance de levains malolactiques* (These de doctorat). Bordeaux.
- Chaïb, A., Claisse, O., Delbarre, E., Bosviel, J., Le Marrec, C., 2022a. Assessment of the lysogenic status in the lactic acid bacterium *O. oeni* during the spontaneous malolactic fermentation of red wines. *Food Microbiol.* 103, 103947. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103947>
- Chaïb, A., Philippe, C., Jaomanjaka, F., Barchi, Y., Oviedo-Hernandez, F., Claisse, O., Le Marrec, C., 2022b. Phage-host interactions as a driver of population dynamics during wine fermentation: Betting on underdogs. *Int. J. Food Microbiol.* 383, 109936. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109936>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R., 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chukeatirote, E., Phongtang, W., Kim, J., Jo, A., Jung, L.-S., Ahn, J., 2018. Significance of bacteriophages in fermented soybeans: A review. *Biomol. Concepts* 9, 131–142. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0012>
- Cibrario, A., Peanne, C., Lailheugue, M., Campbell-Sills, H., Dols-Lafargue, M., 2016. Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC Genomics* 17, 984. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3338-2>
- Cichońska, P., Ziarno, M., 2021. Legumes and Legume-Based Beverages Fermented with Lactic Acid Bacteria as a Potential Carrier of Probiotics and Prebiotics. *Microorganisms* 10, 91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010091>
- Claisse, O., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Philippe, C., Barchi, Y., Lucas, P.M., Le Marrec, C., 2021a. Distribution of Prophages in the *Oenococcus oeni* Species. *Microorganisms* 9, 856. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040856>
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2001. Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde (précurseur d'acroléine) à partir du glycérol par tests moléculaires. *Le Lait* 81, 173–181. <https://doi.org/10.1051/lait:2001121>
- Clarke, B., 1972. Density-Dependent Selection. *Am. Nat.* 106, 1–13. <https://doi.org/10.1086/282747>
- Clokier, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45.

<https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>

- Coelho, C., Gougeon, R.D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2019. Chemical transfers occurring through *Oenococcus oeni* biofilm in different enological conditions. *Front. Nutr.* 6, 95.
- Coelho, R.M.D., Almeida, A.L. de, Amaral, R.Q.G. do, Mota, R.N. da, Sousa, P.H.M. de, 2020. Kombucha: Review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 22, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Colombo, S., Arioli, S., Gargari, G., Neri, E., Della Scala, G., Mora, D., 2018. Characterization of airborne viromes in cheese production plants. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1444–1454. <https://doi.org/10.1111/jam.14046>
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L., 2016. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 66, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7617–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700440104>
- Costello, P.J., Henschke, P.A., 2002. Mousy Off-Flavor of Wine: Precursors and Biosynthesis of the Causative N-Heterocycles 2-Ethyltetrahydropyridine, 2-Acetyltetrahydropyridine, and 2-Acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7079–7087 <https://doi.org/10.1021/jf020341r>.
- Coton, M., Laplace, J.M., Auffray, Y., Coton, E., 2006. “Framboisé” spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. *LWT - Food Sci. Technol.* 39, 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.005>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E., 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol.* 27, 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012>
- Cousin, Fabien J., Le Guellec, R., Chagnot, C., Goux, D., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., Cretenet, M., 2019. *Oenococcus sicerae* sp. nov., isolated from French cider. *Syst. Appl. Microbiol.* 42, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.12.006>
- CRISPR Spacer Database and Exploration Tool [WWW Document], n.d. URL <http://crispr.genome.ulaval.ca/> (accessed 11.14.22).
- Cuamatzin-García, L., Rodríguez-Rugarcía, P., El-Kassis, E.G., Galicia, G., Meza-Jiménez, M. de L., Baños-Lara, Ma. del R., Zaragoza-Maldonado, D.S., Pérez-Armendáriz, B., 2022a. Traditional Fermented Foods and Beverages from around the World and Their Health Benefits. *Microorganisms* 10, 1151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061151>
- Davis, C., Silveira, N.F., Fleet, G.H., 1985. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 872–876. <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.872-876.1985>
- Davray, D., Deo, D., Kulkarni, R., 2021. Plasmids encode niche-specific traits in Lactobacillaceae. *Microb. Genomics* 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000472>
- De Filippis, F., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D., 2018. Different temperatures select distinctive acetic acid

- bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiol.* 73, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>
- De Miranda, J.F., Ruiz, L.F., Silva, C.B., Uekane, T.M., Silva, K.A., Gonzalez, A.G.M., Fernandes, F.F., Lima, A.R., 2022. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *J. Food Sci.* 87, 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Devoto, A.E., Santini, J.M., Olm, M.R., Anantharaman, K., Munk, P., Tung, J., Archie, E.A., Turnbaugh, P.J., Seed, K.D., Blehman, R., Aarestrup, F.M., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2019. Megaphages infect *Prevotella* and variants are widespread in gut microbiomes. *Nat. Microbiol.* 4, 693–700. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0338-9>
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D., 1995. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 395–397. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-395>
- Dimmock, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N., 2015. Introduction to Modern Virology. John Wiley *et al* Sons.
- Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O., Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., Dols- Lafargue, M., 2016. Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiol.* 53, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.011>
- Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S., 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dion, M.B., Plante, P.-L., Zufferey, E., Shah, S.A., Corbeil, J., Moineau, S., 2021. Streamlining CRISPR spacer-based bacterial host predictions to decipher the viral dark matter. *Nucleic Acids Res.* 49, 3127–3138. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab133>
- Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A., 2003. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J. Appl. Microbiol.* 94, 738–746. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01907.x>
- Doudna Lab©, 2022. CRISPR Systems.
- Duckworth, D.H., 1976. Who discovered bacteriophage? *Am. Soc. Microbiol. Bacteriol. Rev.* p. 793-802, 10.
- Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., De Paepe, M., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A., Chaillou, S., 2020. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: A comparative study of rapid procedures for extracting viral particles. *Food Microbiol.* 85, 103278. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103278>
- Đurović, G., Alawamleh, A., Carlin, S., Maddalena, G., Guzzon, R., Mazzoni, V., Dalton, D.T., Walton, V.M., Suckling, D.M., Butler, R.C., Angeli, S., De Cristofaro, A., Anfora, G., 2021. Liquid Baits with *Oenococcus oeni* Increase Captures of *Drosophila suzukii*. *Insects* 12, 66. <https://doi.org/10.3390/insects12010066>
- Eckel, V.P.L., Ziegler, L.-M., Vogel, R.F., Ehrmann, M., 2020. *Bifidobacterium tibiigranuli* sp. nov. isolated from homemade water kefir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 1562–1570. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003936>
- Egido, J.E., Costa, A.R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P.-J., Brouns, S.J.J., 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>
- El Gharniti, F., Dols-Lafargue, M., Bon, E., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Lonvaud, A., Le Marrec, C., 2012. IS30 elements are mediators of genetic diversity in *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 14–22.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.009>
- El Khoury, M., Campbell-Sills, H., Salin, F., Guichoux, E., Claisse, O., Lucas, P.M., 2017. Biogeography of *Oenococcus oeni* Reveals Distinctive but Nonspecific Populations in Wine-Producing Regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e02322-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02322-16>
- Ellis, E.L., Delbrück, M., 1939. THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE. *J. Gen. Physiol.* 22, 365–384. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.365>
- Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L., Salminen, S., 2018. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose-Fermenting Microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01290-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01290-18>
- Endo, A., Okada, S., 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting *Oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2345–2348. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64288-0>
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., Sorek, R., 2017. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Eugster, M.R., Morax, L.S., Hüls, V.J., Huwiler, S.G., Leclercq, A., Lecuit, M., Loessner, M.J., 2015. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*: Bacteriophage influences *Listeria* serovars. *Mol. Microbiol.* 97, 33–46. <https://doi.org/10.1111/mmi.13009>
- Farag, M.A., Saleh, H.A., El Ahmady, S., Elmassry, M.M., 2021. Dissecting Yogurt: the Impact of Milk Types, Probiotics, and Selected Additives on Yogurt Quality. *Food Rev. Int.* 1–17. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1877301>
- Favier, M., Bilhère, E., Lonvaud-Funel, A., Moine, V., Lucas, P.M., 2012. Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. *PLOS ONE* 7, e49082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049082>
- Felipe-Ruiz, A., Marina, A., Rocha, E.P., 2022. Structural and Genomic Evolution of RRNPPA Systems and Their Pheromone Signaling. *Mbio* e02514-22.
- Filannino, P., Di Cagno, R., Addante, R., Pontonio, E., Gobbetti, M., 2016. Metabolism of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the *Apis mellifera* L. Bee Gut: Phenolic Acids as External Electron Acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6899–6911. <https://doi.org/10.1128/AEM.02194-16>
- Filannino, P., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2018. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.016>
- Filannino, P., Di Cagno, R., Tlais, A.Z.A., Cantatore, V., Gobbetti, M., 2019. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Crit. Rev. Microbiol.* 45, 65–81. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1543649>
- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Pot, B., 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.007>
- Fremaux, C., Aigle, M., Lonvaud-Funel, A., 1993. Sequence Analysis of *Leuconostoc oenos* DNA: Organization of pLo13, a Cryptic Plasmid. *Plasmid* 30, 212–223. <https://doi.org/10.1006/plas.1993.1053>
- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., Loessner, M.J., 2000. Gene Cloning and Expression and Secretion of *Listeria monocytogenes* Bacteriophage-Lytic Enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2951–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2951-2958.2000>

- Galli, A., Fiori, E., Franzetti, L., Pagani, M., Ottogalli, G., 1995. Composizione microbiologica e chimica dei granuli di Kefir "di frutta."
- Garofalo, C., Ferrocino, I., Reale, A., Sabbatini, R., Milanović, V., Alkić-Subašić, M., Boscaino, F., Aquilanti, L., Pasquini, M., Trombetta, M.F., Tavoletti, S., Coppola, R., Cocolin, L., Blesić, M., Sarić, Z., Clementi, F., Osimani, A., 2020. Study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. *Food Res. Int.* 137, 109369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109369>
- Garvey, M., 2022. Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety. *Antibiotics* 11, 1324. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324>
- Garvie, E.I., 1967. *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J. Gen. Microbiol.* 48, 431–438. <https://doi.org/10.1099/00221287-48-3-431>
- Gendre, J., Le Marrec, C., Petit Marie-Agnès, P., landaud, sophie, Dugat-Bony, E., 2022. Mise au point d'une méthode d'extraction de particules virales à partir de légumes fermentés à des fins d'analyse de métaviromes.
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F.J., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., Foligné, B., 2018. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 9, 2899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>
- Gervasi, T., Horn, N., Wegmann, U., Dugo, G., Narbad, A., Mayer, M.J., 2014a. Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2495–2505. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5128-y>
- Gervasi, T., Lo Curto, R., Minniti, E., Narbad, A., Mayer, M.J., 2014b. Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 355–361. <https://doi.org/10.1111/lam.12298>
- Gilroy, R., Ravi, A., Getino, M., Pursley, I., Horton, D.L., Alikhan, N.-F., Baker, D., Gharbi, K., Hall, N., Watson, M., Adriaenssens, E.M., Foster-Nyarko, E., Jarju, S., Secka, A., Antonio, M., Oren, A., Chaudhuri, R.R., La Ragione, R., Hildebrand, F., Pallen, M.J., 2021. Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture. *PeerJ* 9, e10941. <https://doi.org/10.7717/peerj.10941>
- Göller, P.C., Elsener, T., Lorgé, D., Radulovic, N., Bernardi, V., Naumann, A., Amri, N., Khatchatourova, E., Coutinho, F.H., Loessner, M.J., Gómez-Sanz, E., 2021. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater. *Nat. Commun.* 12, 6965. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27037-6>
- Goode, J., 2018. *Flawless: Understanding Faults in Wine*. Univ of California Press.
- Gosset, M., Roques, C., Taillandier, P., 2022. Microbial biofilms in oenology. *OENO One* 56, 167–184. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5537>
- Goulet, A., Cambillau, C., 2021. Structure and Topology Prediction of Phage Adhesion Devices Using AlphaFold2: The Case of Two *Oenococcus oeni* Phages. *Microorganisms* 9, 2151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102151>
- Grandvalet, C., 2017. *Oenococcus oeni*: Queen of the cellar, nightmare of geneticists: This article is part of the Microbe Profiles collection. *Microbiology* 163, 297–299. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000456>
- Guérin, H., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M.-P., 2022. Structural variations and roles of rhamnose-rich cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* 298, 102488.

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102488>

- Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, M.A., Ludwig, W., Vogel, R.F., 2013. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1082–1091. <https://doi.org/10.1111/jam.12124>
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2011. The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Gustaw, K., Niedźwiedź, I., Rachwał, K., Polak-Berecka, M., 2021. New Insight into Bacterial Interaction with the Matrix of Plant-Based Fermented Foods. *Foods* 10, 1603. <https://doi.org/10.3390/foods10071603>
- Guzel-Seydim, Z.B., Gökırmaklı, Ç., Greene, A.K., 2021. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* 113, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>
- Hall, A.R., Scanlan, P.D., Morgan, A.D., Buckling, A., 2011. Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection: Bacteria-phage coevolutionary dynamics. *Ecol. Lett.* 14, 635–642. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01624.x>
- Hampton, H.G., Watson, B.N.J., Fineran, P.C., 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* 577, 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Hanemaaijer, L., Kelleher, P., Neve, H., Franz, C., de Waal, P., van Peij, N., van Sinderen, D., Mahony, J., 2021. Biodiversity of Phages Infecting the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Microorganisms* 9, 1822. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091822>
- Hay, I.D., Lithgow, T., 2019. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy. *EMBO Rep.* 20. <https://doi.org/10.15252/embr.201847427>
- Hendrix, R.W., 1999. Evolution: The long evolutionary reach of viruses. *Curr. Biol.* 9, R914–R917. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80103-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80103-7)
- Henick-Kling, T., Lee, T.H., Nicholas, D.J.D., 1986. Characterization of the lytic activity of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* isolated from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 525–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01725.x>
- Hobbs, Z., Abedon, S.T., 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic.’ *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>
- Hooton, S.P.T., Brathwaite, K.J., Connerton, I.F., 2016. The Bacteriophage Carrier State of *Campylobacter jejuni* Features Changes in Host Non-coding RNAs and the Acquisition of New Host-derived CRISPR Spacer Sequences. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00355>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., Słomski, R., 2017. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 65, 233–240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Hynes, A.P., Rousseau, G.M., Lemay, M.-L., Horvath, P., Romero, D.A., Fremaux, C., Moineau, S., 2017. An anti-CRISPR from a virulent streptococcal phage inhibits *Streptococcus pyogenes* Cas9. *Nat. Microbiol.* 2, 1374–1380. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0004-7>
- Iglesias, N.G., Hens, D.V.L., Olguin, N.T., Bravo-Ferrada, B.M., Brizuela, N.S., Tymczyszyn, E.E., Bibiloni, H., Caballero, A.C., Delfederico, L., Semorile, L., 2018. Genome Sequence of *Oenococcus oeni* UNQOe19, the First Fully Assembled Genome Sequence of a Patagonian Psychrotrophic Oenological Strain. *Microbiol. Resour. Announc.* 7. <https://doi.org/10.1128/MRA.00889-18>

- Isaev, A.B., Musharova, O.S., Severinov, K.V., 2021. Microbial Arsenal of Antiviral Defenses. Part II. Biochem. Mosc. 86, 449–470. <https://doi.org/10.1134/S0006297921040064>
- Jakob, F., Stahl, L., Vogel, R.F., 2021. β -glucan formation is a selective advantage for beer-spoiling *Levilactobacillus brevis* TMW 1.2112 during planktonic growth. Microbiol. Res. 243, 126648. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126648>
- Jaomanjaka, F., Claisse, O., Blanche-Barbat, M., Petrel, M., Ballestra, P., Marrec, C.L., 2016. Characterization of a new virulent phage infecting the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. Food Microbiol. 54, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.016>
- Jayabalan, R., Malbaša, R., Sathishkumar, M., 2016. Kombucha. reference module in food sciences.
- Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M., 2014. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus: A review on kombucha.... Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13, 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Jiang, J., Sumbly, K.M., Sundstrom, J.F., Grbin, P.R., Jiranek, V., 2018. Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment. Food Microbiol. 73, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.005>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johansen, P., Jespersen, L., 2017. Impact of quorum sensing on the quality of fermented foods. Curr. Opin. Food Sci. 13, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.001>
- Julien, P., 1977. Liste bibliographique des travaux de Balard. Rev. Hist. Pharm. 65, 137–146.
- Junqueira, A.C. de O., Vinícius de Melo Pereira, G., Viesser, J.A., de Carvalho Neto, D.P., Querne, L.B.P., Soccol, C.R., 2022. Isolation and selection of fructose-consuming lactic acid bacteria associated with coffee bean fermentation. Food Biotechnol. 36, 58–75. <https://doi.org/10.1080/08905436.2021.2007119>
- Karina, T.M.-G., Uéllina, S.S., Marcia, R.S., Ferlando, L.S., Itaciara, L.N., 2018. Production of rice cereal-based Kefir beverage. Afr. J. Biotechnol. 17, 322–327. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16362>
- Kauffman, K.M., Chang, W.K., Brown, J.M., Hussain, F.A., Yang, J., Polz, M.F., Kelly, L., 2022. Resolving the structure of phage–bacteria interactions in the context of natural diversity. Nat. Commun. 13, 372. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27583-z>
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., 2011. Bacterial and β -proteobacterial diversity in *Olea europaea* var. mastoidis- and *O. europaea* var. koroneiki-generated olive mill wastewaters: influence of cultivation and harvesting practice on bacterial community structure. World J. Microbiol. Biotechnol. 27, 57–66.
- Kawai, Y., Mickiewicz, K., Errington, J., 2018. Lysozyme Counteracts β -Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria. Cell 172, 1038–1049.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.021>
- Kieft, K., Zhou, Z., Anantharaman, K., 2020. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. Microbiome 8, 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00867-0>
- Kim, J., Adhikari, K., 2020. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. Beverages 6, 15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010015>
- Knowles, B., Silveira, C.B., Bailey, B.A., Barott, K., Cantu, V.A., Cobián-Güemes, A.G., Coutinho, F.H., Dinsdale,

- E.A., Felts, B., Furby, K.A., George, E.E., Green, K.T., Gregoracci, G.B., Haas, A.F., Haggerty, J.M., Hester, E.R., Hisakawa, N., Kelly, L.W., Lim, Y.W., Little, M., Luque, A., McDole-Somera, T., McNair, K., de Oliveira, L.S., Quistad, S.D., Robinett, N.L., Sala, E., Salamon, P., Sanchez, S.E., Sandin, S., Silva, G.G.Z., Smith, J., Sullivan, C., Thompson, C., Vermeij, M.J.A., Youle, M., Young, C., Zgliczynski, B., Brainard, R., Edwards, R.A., Nulton, J., Thompson, F., Rohwer, F., 2016. Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature* 531, 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature17193>
- Krams, R., Gudra, D., Popovs, S., Willow, J., Krama, T., Munkevics, M., Megnis, K., Jöers, P., Fridmanis, D., Contreras Garduño, J., Krams, I.A., 2022. Dominance of Fructose-Associated Fructobacillus in the Gut Microbiome of Bumblebees (*Bombus terrestris*) Inhabiting Natural Forest Meadows. *Insects* 13, 98. <https://doi.org/10.3390/insects13010098>
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., Mishra, V., 2021. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants* 10, 1185. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Kyrkou I, Byth Carstens A, Ellegaard-Jensen L, *et al.* Expanding the Diversity of Myoviridae Phages Infecting Lactobacillus plantarum-A Novel Lineage of Lactobacillus Phages Comprising Five New Members. *Viruses*. 2019;11(7):611.
- Kyrkou I, Carstens AB, Ellegaard-Jensen L, *et al.* 2020. Isolation and characterisation of novel phages infecting Lactobacillus plantarum and proposal of a new genus, "Silenusvirus". *Sci Rep* 10(1):8763.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Labrie SJ, Mosterd C, Loignon, S *et al.* 2019. A mutation in the methionine aminopeptidase gene provides phage resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Sci Rep* 9 :13816.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 874–880.
- Langenfeld, K., Chin, K., Roy, A., Wigginton, K., Duhaime, M.B., 2021. Comparison of ultrafiltration and iron chloride flocculation in the preparation of aquatic viromes from contrasting sample types. *PeerJ* 9, e11111. <https://doi.org/10.7717/peerj.11111>
- Larisika, M., Claus, H., König, H., 2008. Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.081>
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2019. The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. *Front. Microbiol.* 10, 2876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2018a. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol.* 73, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>
- Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., 2016. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1281–1286. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000877>
- Laureys, D., De Vuyst, L., 2017. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J. Appl. Microbiol.* 122, 719–732. <https://doi.org/10.1111/jam.13370>
- Laureys, D., De Vuyst, L., 2014. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>

- Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J., De Vuyst, L., 2017. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2811–2819. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>
- Lavelle K, Sadovskaya I, Vinogradov E, *et al.* 2022. Brussowvirus SW13 requires a cell surface-associated polysaccharide to recognize its *Streptococcus thermophilus* host. *Appl Environ Microbiol.* 88(1):e0172321.
- Léa, L., 2021. Kombuchas et kéfirs de fruits : les premières données conso confirment leur potentiel. *Circuits Bio- Spéc. Mag. Bio.*
- Ledormand, P., Desmasures, N., Bernay, B., Goux, D., Rué, O., Midoux, C., Monnet, C., Dalmasso, M., 2022a. Molecular approaches to uncover phage-lactic acid bacteria interactions in a model community simulating fermented beverages. *Food Microbiol.* 107, 104069. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104069>
- Ledormand, P., Desmasures, N., Dalmasso, M., 2021. Phage community involvement in fermented beverages: an open door to technological advances? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 61, 2911–2920. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790497>
- Ledormand, P., Desmasures, N., Midoux, C., Rué, O., Dalmasso, M., 2022b. Investigation of the Phageome and Prophages in French Cider, a Fermented Beverage. *Microorganisms* 10, 1203. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061203>
- Lee, S.-J., Jeon, H.-S., Yoo, J.-Y., Kim, J.-H., 2021. Some Important Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria Originated from Kimchi. *Foods* 10, 2148. <https://doi.org/10.3390/foods10092148>
- Leech, J., Cabrera-Rubio, R., Walsh, A.M., Macori, G., Walsh, C.J., Barton, W., Finnegan, L., Crispie, F., O’Sullivan, O., Claesson, M.J., Cotter, P.D., 2020. Fermented-Food Metagenomics Reveals Substrate-Associated Differences in Taxonomy and Health-Associated and Antibiotic Resistance Determinants. *mSystems* 5, e00522-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00522-20>
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., Smith, D.B., 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46, D708– D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Le Marrec C, van Sinderen D, Walsh L, *et al.* 1997. Two groups of bacteriophages infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol* 63(8):3246-3253.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., du Toit, M., 2010. Malolactic fermentation: the ABC’s of MLF. *South Afr. J. Enol. Vitic.*31.
- Licandro, H., Ho, P.H., Nguyen, T.K.C., Petchkongkaew, A., Nguyen, H.V., Chu-Ky, S., Nguyen, T.V.A., Lorn, D., Waché, Y., 2020. How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products? *Food Control* 110, 106957. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106957>
- Liu, S.-Q., 2002. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92, 589–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x>
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 317–331. <https://doi.org/10.1023/A:1002088931106>.
- Lonvaud-Funel, A., 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 209–214. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00020-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00020-6)

- Lorentzen, M.P., Campbell-Sills, H., Jorgensen, T.S., Nielsen, T.K., Coton, M., Coton, E., Hansen, L., Lucas, P.M., 2019. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC Genomics* 20, 330. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5692-3>
- Lorentzen, M.P.G., Lucas, P.M., 2019. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2937–2945. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09689-z>
- Lu, M.-J., Henning, U., 1994. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends Microbiol.* 2, 137–139. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90601-7](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90601-7)
- Lwoff, A., 1953. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.* 17, 269–337.
- Lynch, K.M., Wilkinson, S., Daenen, L., Arendt, E.K., 2021a. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int. J. Food Microbiol.* 345, 109128. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
- Maeno, S., Nishimura, H., Tanizawa, Y., Dicks, L., Arita, M., Endo, A., 2021. Unique niche-specific adaptation of fructophilic lactic acid bacteria and proposal of three *Apilactobacillus* species as novel members of the group. *BMC Microbiol.* 21, 41. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02101-9>
- Magalhães, K.T., de M. Pereira, G.V., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2010. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1241–1250. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0294-x>
- Mahony, J., 2021. Cell Surface Polysaccharides Represent a Common Strategy for Adsorption among Phages Infecting Lactic Acid Bacteria: Lessons from Dairy Lactococci and Streptococci. *mSystems* 6, e00641-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00641-21>
- Mahony, J., Frantzen, C., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Theodorou, I., Kelleher, P., Chapot-Chartier, M., Cambillau, C., Holo, H., Sinderen, D., 2020. The CWPS Rubik’s cube: Linking diversity of cell wall polysaccharide structures with the encoded biosynthetic machinery of selected *Lactococcus lactis*
- Mahony, J., van Sinderen, D., 2022. Virome studies of food production systems: time for ‘farm to fork’ analyses. *Curr. Opin. Biotechnol.* 73, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.014>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O’Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J., Koonin, E.V., 2011. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Manning, A.J., Kuehn, M.J., 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H.M., Poranen, M.M., Díaz-Muñoz, S.L., 2021. Black box of phage–bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies. *Open Biol.* 11, 210188. <https://doi.org/10.1098/rsob.210188>
- Marcelli, B., de Jong, A., Janzen, T., Kok, J., Kuipers, O.P., 2020. Alternative phage–host interaction in *Lactococcus lactis* : the carrier state drives rapid evolution of phages (preprint). *Evolutionary Biology*.

<https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063958>

- Marcobal, A.M., Sela, D.A., Wolf, Y.I., Makarova, K.S., Mills, D.A., 2008. Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J. Bacteriol.* 190, 564–570. <https://doi.org/10.1128/JB.01457-07>
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2013. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 79–85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248>
- Martín, R., Escobedo, S., Suárez, J.E., 2010. Induction, structural characterization, and genome sequence of Lv1, a prophage from a human vaginal *Lactobacillus jensenii* strain. *Int. Microbiol.* 113–121. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.116>
- Martínez, B., Rodríguez, A., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M.-P., 2020. Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 538–564. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa021>
- Martínez Leal, J., Valenzuela Suárez, L., Jayabalan, R., Huerta Oros, J., Escalante-Aburto, A., 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - J. Food* 16, 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C., 2017. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 559–571. <https://doi.org/10.1111/ijfs.1331>
- Mathialagan, M., Thangaraj Edward, Y.S.J., David, P.M.M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M.R., Mohankumar, S., 2018. Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7, 894–906. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096>
- Matos, R.C., Lapaque, N., Rigottier-Gois, L., Debarbieux, L., Meylheuc, T., Gonzalez-Zorn, B., Repoila, F., Lopes, M. de F., Serror, P., 2013. Enterococcus faecalis Prophage Dynamics and Contributions to Pathogenic Traits. *PLoS Genet.* 9, e1003539. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003539>
- Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., Newton, I.L.G., 2012. Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. *PLoS ONE* 7, e32962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032962>
- Mc Govern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., Lordkipanidze, D., 2017. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114>
- Mickiewicz, K.M., Kawai, Y., Drage, L., Gomes, M.C., Davison, F., Pickard, R., Hall, J., Mostowy, S., Aldridge, P.D., Errington, J., 2019. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection. *Nat. Commun.* 10, 4379. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12359-3>
- Mooney, D.T., Jann, M., Geller, B.L., 2006. Subcellular location of phage infection protein (Pip) in *Lactococcus lactis*. *Can. J. Microbiol.* 52, 664–672. <https://doi.org/10.1139/w06-013>
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2005. Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 265–286. <https://doi.org/10.1080/10408690490478118>
- Moretti, A.F., Moure, M.C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., León-Peláez, Á., 2022a. Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods* 5, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

- Muller-Thurgau, H., Osterwalder, A., 1913. Die Bakterien in Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. Zentbl BaktAbt 2 36, 129.
- Mushegian, A.R., 2020. Are There 10³¹ Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? J. Bacteriol. 202. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Ścibisz, I., Kołożyn-Krajewska, D., 2017. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. CyTA - J. Food 15, 601–607. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>
- Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A.M., Jazaeri, S., 2016. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. Electron. J. Biotechnol. 21, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.03.001>
- Nisiotou, A.A., Dourou, D., Filippousi, M.-E., Diamantea, E., Fragkoulis, P., Tassou, C., Banilas, G., 2015. Genetic and Technological Characterisation of Vineyard- and Winery-Associated Lactic Acid Bacteria. BioMed Res. Int. 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/508254>
- Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., Sorek, R., 2018. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. Nat. Microbiol. 3, 90–98. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>
- Ofir, G., Sorek, R., 2017. Vesicles Spread Susceptibility to Phages. Cell 168, 13–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.035>
- Oh, J.-H., Alexander, L.M., Pan, M., Schueler, K.L., Keller, M.P., Attie, A.D., Walter, J., van Pijkeren, J.-P., 2019. Dietary Fructose and Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Bacteriophage Production in the Gut Symbiont *Lactobacillus reuteri*. Cell Host Microbe 25, 273-284.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.016>
- Oliphant, S.A., Watson-Haigh, N.S., Sumbly, K.M., Gardner, J., Groom, S., Jiranek, V., 2022. *Apilactobacillus apisilvae* sp. nov., *Nicolia spurrieriana* gen. nov. sp. nov., *Bombilactobacillus folatiphilus* sp. nov. and *Bombilactobacillus thymidiniphilus* sp. nov., four new lactic acid bacterial isolates from stingless bees *Tetragonula carbonaria* and *Austroplebeia australis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005588>
- Onetto, C.A., Costello, P.J., Kolouchova, R., Jordans, C., McCarthy, J., Schmidt, S.A., 2021. Analysis of Transcriptomic Response to SO₂ by *Oenococcus oeni* Growing in Continuous Culture. Microbiol. Spectr. 9, e01154-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01154-21>
- Ongena, V., Briegel, A., Claessen, D., 2021. Cell wall deficiency as an escape mechanism from phage infection. Open Biol. 11, 210199. <https://doi.org/10.1098/rsob.210199>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R., 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res. 42, D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Paillet, T., Dugat-Bony, E., 2021. Bacteriophage ecology of fermented foods: anything new under the sun? Curr. Opin. Food Sci. 40, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.03.007>
- Park, D.-W., Kim, S.-H., Park, J.-H., 2022. Distribution and characterization of prophages in *Lactobacillus plantarum* derived from kimchi. Food Microbiol. 102, 103913. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103913>
- Park, E.-J., Kim, K.-H., Abell, G.C.J., Kim, M.-S., Roh, S.W., Bae, J.-W., 2011. Metagenomic Analysis of the Viral

- Communities in Fermented Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/AEM.01859-10>
- Pasolli, E., De Filippis, F., Mauriello, I.E., Cumbo, F., Walsh, A.M., Leech, J., Cotter, P.D., Segata, N., Ercolini, D., 2020. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nat. Commun.* 11, 2610. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16438-8>
- Pechurina, A., 2020. Researching identities through material possessions: The case of diasporic objects. *Curr. Sociol.* 68, 669–683. <https://doi.org/10.1177/0011392120927746>
- Petri, A., Rabenstein, A., Kuever, J., König, H., 2015. Application of MALDI-TOF-MS and nested SAPD-PCR for discrimination of *Oenococcus oeni* isolates at the strain level. *J. Wine Res.* 26, 69–80. <https://doi.org/10.1080/09571264.2015.1009015>
- Philippe, C., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Lucas, P.M., Samot, J., Cambillau, C., Le Marrec, C., 2021. Characterization of the First Virulent Phage Infecting *Oenococcus oeni*, the Queen of the Cellars. *Front. Microbiol.* 11, 596541. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.596541>
- Philippe, C., Chaïb, A., Jaomanjaka, F., Cluzet, S., Lagarde, A., Ballestra, P., Decendit, A., Petrel, M., Claisse, O., Goulet, A., Cambillau, C., Le Marrec, C., 2020. Wine Phenolic Compounds Differently Affect the Host-Killing Activity of Two Lytic Bacteriophages Infecting the Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Viruses* 12, 1316. <https://doi.org/10.3390/v12111316>
- Philippe, C., Jaomanjaka, F., Claisse, O., Laforgue, R., Maupeu, J., Petrel, M., Le Marrec, C., 2017. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.014>
- Pidoux, M., 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 223–238. <https://doi.org/10.1007/BF01741847>
- Porchet, B., 1934. Etude d'une boisson fermentée, à base de figues. Station fédérale d'essais viticoles et arboricoles à Lausanne.
- Pothakos, V., De Vuyst, L., Zhang, S.J., De Bruyn, F., Verce, M., Torres, J., Callanan, M., Moccand, C., Weckx, S., 2020. Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria. *Curr. Res. Biotechnol.* 2, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2020.02.001>
- Pourcel, C., Midoux, C., Vergnaud, G., Latino, L., 2017. A carrier state is established in *Pseudomonas aeruginosa* by phage LeviOr01, a newly isolated ssRNA levivirus. *J. Gen. Virol.* 98, 2181–2189. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000883>
- Pswarayi, F., Gänzle, M., 2022. African cereal fermentations: A review on fermentation processes and microbial composition of non-alcoholic fermented cereal foods and beverages. *Int. J. Food Microbiol.* 378, 109815. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109815>
- Qin, Z., Yu, S., Chen, J., Zhou, J., 2022. Dehydrogenases of acetic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 54, 107863. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107863>
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M.A., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L., 2016a. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiol.* 54, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>
- Reed, G., Nagodawithana, T.W., 1991. Use of Yeasts in the Dairy Industry, in: *Yeast Technology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 441–445. https://doi.org/10.1007/978-94-011-9771-7_11

- Refardt, D., 2011. Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *ISME J.* 5, 1451–1460. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.30>
- Reiß, J., 1990. Metabolic activity of Tibi grains. *Z. Für Lebensm.-Unters. -Forsch.* 191, 462–465. Ribéreau-
- Gayon, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2017. *Traité d'œnologie (7e édition ed. Vol. Tome 1); Microbiologie du vin. Vinifications. 7th Ed, Pratiques vitivinicoles.* DUNOD.
- Ripp, S., Miller, R.V., 1997. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* 143, 2065–2070. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-2065>
- Rismondo, J., Gillis, A., Gründling, A., 2021. Modifications of cell wall polymers in Gram-positive bacteria by multi- component transmembrane glycosylation systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 60, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.007>
- Rizzello, C.G., Losito, I., Facchini, L., Katina, K., Palmisano, F., Gobbetti, M., Coda, R., 2016. Degradation of vicine, convicine and their aglycones during fermentation of faba bean flour. *Sci. Rep.* 6, 32452. <https://doi.org/10.1038/srep32452>
- Romero, D.A., Magill, D., Millen, A., Horvath, P., Fremaux, C., 2020. Dairy lactococcal and streptococcal phage– host interactions: an industrial perspective in an evolving phage landscape. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 909–932. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa048>
- Rousset, F., Depardieu, F., Miele, S., Dowding, J., Laval, A.-L., Lieberman, E., Garry, D., Rocha, E.P.C., Bernheim, A., Bikard, D., 2022. Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host Microbe* 30, 740-753.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.02.018>
- Roux, S., Krupovic, M., Daly, R.A., Borges, A.L., Nayfach, S., Schulz, F., Sharrar, A., Matheus Carnevali, P.B., Cheng, J.-F., Ivanova, N.N., Bondy-Denomy, J., Wrighton, K.C., Woyke, T., Visel, A., Kyrpides, N.C., Eloe- Fadrosch, E.A., 2019. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes. *Nat. Microbiol.* 4, 1895–1906. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0510-x>
- Russell, I., Stewart, G.G., 2022. Distilling yeast and fermentation, in: *Whisky and Other Spirits.* Elsevier, pp. 213–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822076-4.00030-9>
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Oguma, K., 2005. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 17472–17477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505503102>
- Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., Moineau, S., 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
- Santos, M.J. dos, 2016. *Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração (Thesis).*
- Sausset, R., Krupova, Z., Guédon, E., Peron, S., Grangier, A., Petit, M.-A., De Sordi, L., De Paepe, M., 2022. Comparison of interferometric light microscopy with nanoparticle tracking analysis for the study of extracellular vesicles and bacteriophages. *bioRxiv* 2022.10.07.511248. <https://doi.org/10.1101/2022.10.07.511248>
- Schwartz, M., Canon, F., Feron, G., Neiers, F., Gamero, A., 2021. Impact of Oral Microbiota on Flavor Perception: From Food Processing to In-Mouth Metabolization. *Foods* 10, 2006.
- Sedó Molina, G.E., Shetty, R., Xiao, H., Wätjen, A.P., Tovar, M., Bang-Berthelsen, C.H., 2022. Development of a

- novel lactic acid bacteria starter culture approach: From insect microbiome to plant-based fermentations. *LWT* 167, 113797. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113797>
- Shen, Y., Loessner, M.J., 2021. Beyond antibacterials – exploring bacteriophages as antivirulence agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 68, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.004>
- Shkoporov, A.N., Khokhlova, E.V., Stephens, N., Hueston, C., Seymour, S., Hryckowian, A.J., Scholz, D., Ross, R.P., Hill, C., 2021. Long-term persistence of crAss-like phage crAss001 is associated with phase variation in *Bacteroides intestinalis*. *BMC Biol.* 19, 163. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01084-3>
- Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M.J., Sutherland, I., Azeredo, J., 2004. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage ϕ S1: the influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.058>
- Sørensen, M.C.H., van Alphen, L.B., Harboe, A., Li, J., Christensen, B.B., Szymanski, C.M., Brøndsted, L., 2011. Bacteriophage F336 Recognizes the Capsular Phosphoramidate Modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168. *J. Bacteriol.* 193, 6742–6749. <https://doi.org/10.1128/JB.05276-11>
- Sørensen, M.C.H., Vitt, A., Neve, H., Soverini, M., Ahern, S.J., Klumpp, J., Brøndsted, L., 2021. *Campylobacter* phages use hypermutable polyG tracts to create phenotypic diversity and evade bacterial resistance. *Cell Rep.* 35, 109214. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109214>
- Spilsberg, B., Sekse, C., Urdahl, A.M., Nesse, L.L., Johannessen, G.S., 2021. Persistence of a Stx-Encoding Bacteriophage in Minced Meat Investigated by Application of an Improved DNA Extraction Method and Digital Droplet PCR. *Front. Microbiol.* 11, 581575. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581575>
- Stadie, J., Gultiz, A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiol.* 35, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>
- Stanley, S.Y., Borges, A.L., Chen, K.-H., Swaney, D.L., Krogan, N.J., Bondy-Denomy, J., Davidson, A.R., 2019. Anti-CRISPR-Associated Proteins Are Crucial Repressors of Anti-CRISPR Transcription. *Cell* 178, 1452–1464.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.046>
- Sumby, K.M., Bartle, L., Grbin, P.R., Jiranek, V., 2019. Measures to improve wine malolactic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2033–2051. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09608-8>
- Sutton, T.D.S., Hill, C., 2019. Gut Bacteriophage: Current Understanding and Challenges. *Front. Endocrinol.* 10, 784. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00784>
- Syrokou, M.K., Papadelli, M., Ntaikou, I., Paramithiotis, S., Drosinos, E.H., 2019. Sugary Kefir: Microbial Identification and Biotechnological Properties. *Beverages* 5, 61. <https://doi.org/10.3390/beverages5040061>
- Szymczak P, Rau MH, Monteiro JM et al. 2021. A comparative genomics approach for identifying host-range determinants in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Sci Rep* 9 :7991.
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzappel, W.H., 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Taylor, V.L., Fitzpatrick, A.D., Islam, Z., Maxwell, K.L., 2019. The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 1–31. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.08.001>
- Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H.G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A., Rodríguez-Morales, S., Merino- Pérez, E., Roa de la Fuente, L.F., Solís-Pereira, S.E., Pérez-Rueda, E., Lizama-Uc, G., 2021.

Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *MicrobiologyOpen* 10. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1183>

- Terrade, N., Mira de Orduña, R., 2009. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.020>
- Terral, J.-F., Bouby, L., 2013. Domestication de la vigne (*Vitis vinifera* L.) et origines de cépages en France : apport de l'archéobiologie. *Food Hist.* 11, 11–25. <https://doi.org/10.1484/J.FOOD.5.102100>
- Terzian, P., Olo Ndela, E., Galiez, C., Lossouarn, J., Pérez Bucio, R.E., Mom, R., Toussaint, A., Petit, M.-A., Enault, F., 2021. PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. *NAR Genomics Bioinforma.* 3, lqab067. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab067>
- Theodorou, I., Courtin, P., Sadovskaya, I., Palussièrre, S., Fenaille, F., Mahony, J., Chapot-Chartier, M.-P., van Sinderen, D., 2020. Three distinct glycosylation pathways are involved in the decoration of *Lactococcus lactis* cell wall glycopolymers. *J. Biol. Chem.* 295, 5519–5532. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010844>
- Thingstad, T.F., 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1320–1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
- Todorov, S.D., Popov, I., Weeks, R., Chikindas, M.L., 2022. Use of Bacteriocins and Bacteriocinogenic Beneficial Organisms in Food Products: Benefits, Challenges, Concerns. *Foods* 11, 3145. <https://doi.org/10.3390/foods11193145>
- Tofalo, R., 2021. Microbial Dynamics in Wine Production. *Microorganisms* 9, 700. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040700>
- Tran, T., Billet, K., Torres-Cobos, B., Vichi, S., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Grandvalet, C., Tourdot-Maréchal, R., 2022. Use of a Minimal Microbial Consortium to Determine the Origin of Kombucha Flavor. *Front. Microbiol.* 13, 836617. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.836617>
- Trudelle, D.M., Bryan, D.W., Hudson, L.K., Denes, T.G., 2019. Cross-resistance to phage infection in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a mutants. *Food Microbiol.* 84, 103239. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.06.003>
- Turner, D., Kropinski, A.M., Adriaenssens, E.M., 2021. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* 13, 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>
- Tzipilevich, E., Habusha, M., Ben-Yehuda, S., 2017. Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell* 168, 186–199.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>
- Uden, G., Eirich, T., Richter, H., 2017. Metabolism and Transport of Sugars and Organic Acids by Lactic Acid Bacteria from Wine and Must, in: König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer International Publishing, Cham, pp. 215–229. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_9
- Vallet-Courbin, A., Lucas, M., Dutilh, L., Miot-Sertier, C., Windholtz, S., Lucas, P., Masneuf-Pomarede, I., Maupeu, J., 2022. L'identification des levures et bactéries œnologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: Langue originale de l'article : français. *IVES Tech. Rev. Vine Wine*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2022.5534>
- Varakumar, S., Naresh, K., Variyar, P.S., Sharma, A., Reddy, O.V.S., 2013. Role of malolactic fermentation on the quality of mango (*Mangifera indica* L.) wine. *Food Biotechnol.* 27, 119–136.

- Veesler, D., Spinelli, S., Mahony, J., Lichière, J., Blangy, S., Bricogne, G., Legrand, P., Ortiz-Lombardia, M., Campanacci, V., van Sinderen, D., Cambillau, C., 2012. Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8954–8958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200966109>
- Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S., 2020. The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol.* 88.
- Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S., 2019. Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel *Oenococcus* Species. *Front. Microbiol.* 10, 479. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., Taillandier, P., 2018a. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review: Understanding Kombucha tea fermentation.... *J. Food Sci.* 83, 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Viridis, C., Sumbly, K., Bartowsky, E., Jiranek, V., 2021. Lactic Acid Bacteria in Wine: Technological Advances and Evaluation of Their Functional Role. *Front. Microbiol.* 11, 612118. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612118>.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., Bezirtzoglou, E., 2020. Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods* 10, 69. <https://doi.org/10.3390/foods10010069>
- von Gastrow, L., Madec, M.-N., Chuat, V., Lubac, S., Morinière, C., Lé, S., Santoni, S., Sicard, D., Valence, F., 2020. Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter. *Microorganisms* 8, 982. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070982>
- Waldor, M.K., Mekalanos, J.J., 1996. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science* 272, 1910–1914. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
- Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., García, M.L., Curtis Hendrickson, R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lambert, A.J., Łobocka, M., Oksanen, H.M., Orton, R.J., Robertson, D.L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D.B., Suzuki, N., Van Doorslaer, K., Vandamme, A.-M., Varsani, A., Zerbini, F.M., 2022. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J. *et al.* 2021. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 166:2633–2648.
- Watson, B., 1993. *Enology Personnel Development and Extension [1992-1993]: Oregon Wine Advisory Board, 1993.* (technical report). Food Science and technology, Oregon State university.
- Węgrzyn, G., 2022. Should Bacteriophages Be Classified as Parasites or Predators? *Pol. J. Microbiol.* 71, 3–9. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-005>
- Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J., López, P., 2006. *Pediococcus parvulus* gtf Gene Encoding the GTF Glycosyltransferase and Its Application for Specific PCR Detection of β -d-Glucan-Producing Bacteria in Foods and Beverages. *J. Food Prot.* 69, 161–169. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.1.161>
- Whitehead, H.R., Cox, G.A., 1936. 130. Bacteriophage Phenomena in Cultures of Lactic Streptococci. *J. Dairy Res.* 7, 55–62. <https://doi.org/10.1017/S0022029900001655>
- Wright, A.V., Nuñez, J.K., Doudna, J.A., 2016. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's

Toolbox for Genome Engineering. *Cell* 164, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>

Xu, Y., 2021. Phage and phage lysins: New era of bio-preservatives and food safety agents. *J. Food Sci.* 86, 3349–3373. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15843>

Yan, Y.L., Hu, Y., Gänzle, M.G., 2018. Prebiotics, FODMAPs and dietary fiber — conflicting concepts in development of functional food products? *Curr. Opin. Food Sci.* 20, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.009>

Yang, D., Woese, C.R., 1989. Phylogenetic structure of the “*leuconostocs*”: an interesting case of a rapidly evolving organism. *Syst. Appl. Microbiol.* 12, 145–149.

Yang, H., Patel, D.J., 2017. New CRISPR-Cas systems discovered. *Cell Res.* 27, 313–314. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.21>

Young, R., 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.* 52, 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>

Zago, M., Scaltriti, E., Fornasari, M.E., Rivetti, C., Grolli, S., Giraffa, G., Ramoni, R., Carminati, D., 2012. Epifluorescence and atomic force microscopy: Two innovative applications for studying phage–host interactions in *Lactobacillus helveticus*. *J. Microbiol. Methods* 88, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.10.006>

Zanirati, D.F., Abatemarco, M., Sandes, S.H. de C., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C., Neumann, E., 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>

Zavaleta, A.I., Martínez-Murcia, A.J., Rodríguez-Valera, F., 1997. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1261–1267.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O’Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zinke, M., Schröder, G.F., Lange, A., 2022. Major tail proteins of bacteriophages of the order Caudovirales. *J. Biol. Chem.* 298, 101472. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101472>.

