



HAL
open science

Étude de la diversité intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*, relation entre variabilité phénotypique et diversité génétique

Julen Bridier

► **To cite this version:**

Julen Bridier. Étude de la diversité intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*, relation entre variabilité phénotypique et diversité génétique. Ingénierie des aliments. 2011. Français. NNT: . tel-02811186

HAL Id: tel-02811186

<https://hal.inrae.fr/tel-02811186>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n°1881

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 décembre 2011

Par Julien BRIDIER

Né le 22/06/1985 à Bayonne

Etude de la diversité intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*

Relation entre variabilité phénotypique et diversité génétique

Membres du Jury

Mr. A. BORDONS	Professeur à l'Université Rovira I Virgili de Catalogne	Rapporteur
Mr. P. RITZENTHALER	Professeur à l'Université Paul Sabatier Toulouse III	Rapporteur
Mr. S. CHAILLOU	Chargé de recherche INRA, Jouy en Josas	Examineur
Mr. F. DELMOTTE	Chargé de recherche INRA, Villenave d'Ornon	Examineur
Mme A. LONVAUD-FUNEL	Professeur à l'Université Bordeaux Segalen	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'institut des sciences de la vigne et du vin, à bordeaux. Elle n'aurait pas pu voir le jour sans de nombreuses personnes que je voudrais remercier.

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement Mme Aline Lonvaud-Funel qui m'a donné l'occasion de réaliser cette thèse et qui m'a accueilli, et encadré durant ces trois années. Merci beaucoup de votre soutien

Je voudrais également remercier Mr Paul Ritzenthaler et Mr Albert Bordons d'avoir accepté la charge de rapporteur pour cette thèse. De plus, je voudrais également remercier Mr Stéphane Chaillou et Mr François Delmotte d'avoir accepté de juger ces travaux pour la soutenance.

Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien financier de l'organisme de recherche ANR, et la création du projet de recherche DIVOENI. Qu'ils en soient eux aussi remerciés.

Par ailleurs, je voudrais également adresser de profonds remerciements à l'ensemble des partenaires du projet, avec qui les discussions et réunions furent enrichissantes, et particulièrement Mr Emmanuel Coton, Mme Monika Coton, Mr Hervé Alexandre et Mme Vanessa David pour leur gentillesse et leur participation à ces travaux.

Je voudrais également remercier la SFR biologie intégrative, et particulièrement Yves Gibon, pour ce partenariat fructueux, et sans qui la réalisation de l'étude phénotypage haut débit n'aurait pas pu être effectuée.

Mes pensées vont aussi au LABRI, pour leur collaboration dans le projet transcriptomique. Je voudrais adresser un très grand merci donc à Elizabeth Bon et Aurélie Goulielmakis pour l'aide inestimable apportée dans l'analyse et la compréhension de ces travaux.

Je voudrais remercier tout particulièrement Mr Olivier Claisse, qui m'a grandement aidé, aussi bien durant les expérimentations au laboratoire, que pour les innombrables discussions que nous avons menées. Un grand merci également à Mme Cécile Miot-Sertier, qui m'a aussi beaucoup aidé lors des multiples problèmes à la paillasse.

Bien évidemment, je remercie toute l'équipe du laboratoire, Guilherme avec qui j'ai eu le plaisir de partager ce bureau, Patrick, Marguerite, Claire, Patricia, Marie-Louise, Joana, Julie, Geoffrey, Marion, Andrea, Rémi, Maria, Mariette, et tous les autres, qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je voudrais enfin remercier mes amis et ma famille, qui m'ont aussi grandement aidé et soutenu, particulièrement durant les derniers mois plus difficiles de la thèse. Je vous remercie du fond du cœur.

Liste des principales abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ANOVA/MANOVA	Analysis of variance, multivariate analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BET	Bromure éthidium
Ct	Cycle treshold
DEPC	Diethylpyrocarbonate
FA	Fermentation alcoolique
FML	Fermentation malolactique
g	Accélération de la pesanteur
Hs	Indice de diversité allélique
LDH	Lactate déshydrogénase
MLST	Multilocus séquence typing
MMR	Mutation mismatch repair
MRS	Milieu de Man, Rogosa et Sharpe
NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide
PCR	Polymerase chain reaction
REA-PFGE	Restriction enzymatic analysis - -pulsed field gel electrophoresis
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single nucleic polymorphism
SSC	Saline sodium citrate
SSH	Suppression subtractive hybridization
ST	Séquence type
TAV	Titre alcoométrique volumique
UFC	Unité formant colonie
VNC	Etat viable non cultivable

Table des matières

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. VINIFICATION ET MICROBIOLOGIE DU VIN.....	12
1.1. LA VINIFICATION	12
1.1.1. Du raisin au moût.....	12
1.1.2. La fermentation alcoolique	13
1.1.3. La fermentation malolactique	13
1.2. LES MICROORGANISMES DU VIN.....	14
1.2.1. Les levures.....	15
1.2.2. Bactéries lactiques	15
1.2.3. Bactéries acétiques.....	16
1.2.4. Evolution du microbiote durant la vinification	16
2. OENOCOCCUS OENI.....	17
2.1. DESCRIPTION L'ESPECE <i>OENOCOCCUS OENI</i>	17
2.2. UTILISATION DE LEVAINS D' <i>OENOCOCCUS OENI</i>	19
2.3. VARIABILITE GENETIQUE CHEZ <i>OENOCOCCUS OENI</i>	20
2.3.1. Etude de l'ADN ribosomal	20
2.3.2. RAPD et AFLP	20
2.3.3. REA-PFGE.....	21
2.3.4. MLST (Multilocus Sequence Typing)	22
2.4. VARIABILITE PHENOTYPIQUE.....	23
3. ADAPTATION ET REPONSE AUX CHOCS ENVIRONNEMENTAUX.....	24
3.1. LE STRESS CHEZ LES BACTERIES	24
3.1.1. Définition	24
3.1.2. La réponse au stress.....	25
3.2. LES TYPES DE STRESS.....	26
3.2.1. « Stress prolongé ».....	26
3.2.2. Stress de type choc	26
3.3. VIN ET CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES POUR LES BACTERIES.....	27
3.4. REPONSE AU STRESS DE LA BACTERIE <i>OENOCOCCUS OENI</i>	32
MATERIEL ET METHODES	
1. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE.....	35
1.1. ETABLISSEMENT DE LA COLLECTION D' <i>OENOCOCCUS OENI</i>	35
1.2. CULTURE DES BACTERIES	35
1.3. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE D'UNE CULTURE	37
1.4. ETUDE DE LA FERMENTATION DES SUCRES	40
1.5. DOSAGES ENZYMATIQUES DES PRODUITS DE LA FERMENTATION.....	41
2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	42
2.1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE.....	42
2.2. EXTRACTION D'ARN ET SYNTHESE D'ADNC	43
2.3. METHODES D'AMPLIFICATION PAR PCR.....	45
2.4. ANALYSE D'ADN PAR ELECTROPHORESE SUR GEL.....	47
2.5. HYBRIDATION ADN/ADN SUR MEMBRANE.....	49
2.6. RESTRICTION GENOMIQUE PAR L'ANALYSE REA-PFGE.....	50
2.7. SEQUENÇAGE DE L'ADN	51
2.8. CONFECTION ET ANALYSE DE LA PUCE TRANSCRIPTOMIQUE	52
3. ANALYSES BIOINFORMATIQUE	53
3.1. ANALYSES DE GENETIQUE DES POPULATIONS	53
3.2. ANALYSES DE STRUCTURES DE POPULATIONS.....	56
3.3. ANALYSES STATISTIQUES	59

RESULTATS ET DISCUSSION

1. DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE <i>OENOCOCCUS OENI</i>	64
1.1. ANALYSE DE LA COLLECTION PAR TYPAGE DES SOUCHES EN REA-PFGE	64
1.2. RELATION ENTRE LE PROFIL PFGE ET L'ORIGINE DES SOUCHES	65
1.3. TYPAGE DE LA COLLECTION PAR MLST	66
1.3.1. <i>Sélection des gènes cibles</i>	66
1.3.2. <i>Diversité allélique de la collection</i>	67
1.3.3. <i>Rapport dn/ds</i>	68
1.3.4. <i>Diversité génomique</i>	69
1.3.5. <i>Construction de l'arbre en Neighbor Joining</i>	69
1.3.6. <i>Analyse multivariée de la variance et analyse discriminante</i>	70
1.3.7. <i>Cas particulier de la souche DIV 5.7</i>	71
1.3.8. <i>Construction d'un minimum spanning tree</i>	72
1.3.9. <i>Recombinaison intragénique</i>	72
1.3.10. <i>Recombinaison intergénique</i>	73
1.3.11. <i>Analyse MLST sans le locus recP</i>	74
1.4. CORRESPONDANCE ENTRE GROUPES PHYLOGENETIQUES ET ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES	75
1.5. ANALYSE DES POPULATIONS EN FONCTION DU TYPE DE PRODUIT D'ORIGINE	76
1.6. RELATION ENTRE L'ANNEE D'ISOLEMENT ET LES GROUPES GENOMIQUES	77
1.7. ANALYSE DE LA PRESENCE DE MARQUEURS GENETIQUES	78
1.7.1. <i>Gènes de métabolisme et de stress</i>	78
1.7.2. <i>Gènes issus de la comparaison des génomes de IOEB 8413 et IOEB 1491</i>	79
1.7.3. <i>Recherche de gènes choisis après hybridation soustractive</i>	80
1.8. DISCUSSION	83
1.8.1. <i>Confrontation des résultats de typage par PFGE et MLST</i>	83
1.8.2. <i>Deux sous-populations évoluant séparément</i>	83
1.8.3. <i>Un troisième groupe phylogénétique</i>	85
1.8.4. <i>Des sous-populations dans chaque groupe</i>	86
1.8.5. <i>Les marqueurs génétiques dans la sélection de souches œnologiques</i>	88
2. ETUDE DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE DANS L'ESPECE <i>OENOCOCCUS OENI</i>	91
2.1. ETUDE PRELIMINAIRE	91
2.2. ETUDE DE LA CAPACITE DE CROISSANCE DES SOUCHES	93
2.2.1. <i>Choix du milieu de culture</i>	93
2.2.2. <i>Influence du pH et de l'éthanol sur la croissance des souches d'<i>Oenococcus oeni</i></i>	94
2.2.3. <i>Analyse des résultats selon les quantités de biomasse formée</i>	95
2.2.4. <i>Classification des souches dans un dendrogramme</i>	97
2.2.5. <i>Relation entre les phénotypes et les groupes phylogénétiques</i>	99
2.2.6. <i>Comparaison des phénotypes de croissance des souches des groupes phylogénétiques A et B</i>	99
2.2.7. <i>Relation entre le phénotype et l'origine géographique</i>	100
2.2.8. <i>Relation entre le phénotype et le type de produit</i>	101
2.3. ETUDE DE LA FERMENTATION DES SUCRES	101
2.3.1. <i>Tests préliminaires</i>	102
2.3.2. <i>Capacité des souches de la collection à fermenter les 9 sucres</i>	103
2.3.3. <i>Capacité de fermentation du glucose et du fructose</i>	104
2.4. DISCUSSION	107
2.4.1. <i>Une grande diversité phénotypique</i>	107
2.4.2. <i>Influence de la constitution des populations</i>	108
2.4.3. <i>Place des levains malolactiques dans l'analyse</i>	108
2.4.4. <i>Relation entre phylogénie et phénotype</i>	109
3. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA REPONSE D'<i>OENOCOCCUS OENI</i> AU STRESS VIN	112
3.1. CHOIX PRELIMINAIRES A L'ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE	112
3.1.1. <i>Choix des souches à utiliser</i>	112
3.1.2. <i>Choix des conditions de stress</i>	113
3.2. EXPRESSION DES GENES ANALYSES PAR HYBRIDATION SUR « PUCE » D'ARN	115
3.2.1. <i>Étude de la qualité des ARNs et des hybridations</i>	115
3.2.2. <i>Analyse de l'expression des gènes</i>	116
3.2.3. <i>Étude de la fonction possible des gènes</i>	117
3.3. ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES PAR QRT-PCR	121
3.3.1. <i>Sélection de gènes cibles</i>	121

3.3.2.	<i>Validation des résultats obtenus par hybridation de la « puce »</i>	122
3.3.3.	<i>Etude de diversité de transcription chez 9 souches</i>	122
3.4.	DISCUSSION	124

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INDEX

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

INTRODUCTION

Le vin est le fruit de longues transformations chimiques et biologiques dont la matière première est le raisin. Il est défini par « le produit exclusivement obtenu par la fermentation alcoolique totale ou partielle de raisin frais, foulés ou non, ou du moût de raisin ». Le vin est préparé depuis longtemps, des traces de vin et de vinification ayant été trouvées dans des sites de fouilles datés de 7000 ans en Iran. Dans l'antiquité, et jusqu'à la fin du Moyen Age, le vin est couramment consommé, et même utilisé en médecine pour soigner toutes sortes d'affections. Il évolue au cours des siècles, avec les procédés de fabrication. De nos jours, le vin est accessible à tous, et est produit dans le monde entier. Dans de nombreux pays, les vignes sont cultivées, et le goût, la couleur, les arômes des vins produits varient énormément. Partout, les processus de vinification sont de plus en plus étudiés et contrôlés, dans la recherche constante de l'amélioration de la qualité.

La technologie permet de maîtriser les étapes de la vinification. La précision dans la date des vendanges, le soin apporté au raisin, la température durant les fermentations, le type de bois choisi pour les barriques servant à l'élevage, et les diverses opérations œnotechniques au chai sont autant de paramètres importants. Mais le vin est avant tout un produit de fermentation, d'où l'importance de l'étude des microorganismes. Les levures, parmi elles *Saccharomyces cerevisiae*, et les bactéries lactiques, dont *Oenococcus oeni* sont ainsi directement impliqués dans la réussite de la vinification. La première étape, la fermentation alcoolique (FA), est réalisée par les levures, dont le métabolisme le plus évident conduit des sucres à l'éthanol. La deuxième est la fermentation malolactique (FML), assurée surtout par la bactérie *O. oeni*, qui métabolise l'acide L-malique en acide L-lactique, ce qui a pour effet un assouplissement des vins, et une meilleure stabilité microbienne. Ces microorganismes sont présents naturellement sur la baie de raisin, et se retrouvent dans le moût de raisin après le foulage.

La capacité d'adaptation au moût et au vin varie grandement entre les espèces mais aussi d'une souche à l'autre, au sein d'une même espèce. La réussite des fermentations en

dépend, certaines souches ont des rendements de transformation faibles, ou bien favorisent l'implantation de bactéries d'altération. Pour pallier à ce problème, de plus en plus de producteurs utilisent des levains industriels, que ce soit de levures, ou de bactéries, avec des souches choisies pour réaliser rapidement la fermentation. Concernant les bactéries lactiques, la sélection des souches se fait sur le critère de l'adaptation aux conditions physicochimiques du vin, et de la capacité de croissance, qui sont les paramètres primordiaux pour la réussite de la FML.

Plusieurs études ont montré la grande variabilité dans l'espèce *O. oeni*, que ce soit au niveau de propriétés physiologiques et métaboliques (la croissance dans les vins, la réussite de la FML, la production de composés aromatiques), ou au niveau de la diversité génétique. Cette grande diversité explique la différence de comportement des souches sélectionnées comme levains malolactiques, avec souvent des résultats aléatoires. Il est donc important de sélectionner les meilleures souches, capables de résister au vin (pH acide, titre alcoométrique fort, présence de divers inhibiteurs bactériens). Pour cela, il faut comprendre pourquoi certaines souches sont plus adaptées, et comment elles résistent mieux à leur environnement. L'étude des mécanismes de résistance au stress devient de plus en plus d'actualité chez cette espèce, dans le but de sélectionner plus efficacement les futurs levains malolactiques.

La variabilité génétique de l'espèce a été maintes fois étudiée, par différentes méthodes. Une grande diversité en ressort, avec une particularité, plusieurs fois notée : cette espèce est vraisemblablement divisée en deux sous-populations. Mais peu d'études ont visé à relier la variabilité phénotypique génétique. C'est ce que cette étude se propose de faire. Pour cela, une collection très variée et fournie a été rassemblée au laboratoire, pour tenter d'avoir une meilleure représentativité de l'espèce que dans les études antérieures. Cette collection composée de plus de 510 souches a pu être élaborée grâce à la participation de nombreux partenaires, et est à ce jour une des plus grandes collections d'*O. oeni*. A partir de ce formidable outil, il est possible d'accéder aux caractères de l'espèce entière.

Dans une première partie, la diversité génétique de l'espèce a été analysée, à l'aide de trois techniques majeures, utilisées couramment en génétique bactérienne, l'analyse Multilocus Sequence Typing (MLST), la restriction génomique (REA-PFGE), et l'étude de la présence de marqueurs génétiques. Le but a été de connaître le fond génétique de l'espèce, et de confirmer la présence des deux sous populations, mais cette étude a permis de mieux comprendre l'évolution de l'espèce, et la variabilité au sein des régions et pays du monde.

Dans une deuxième partie, la diversité phénotypique des souches a été étudiée. L'analyse d'un grand nombre de souches, a abouti à une estimation de la variabilité phénotypique de l'espèce, et a permis de mettre au point une nouvelle méthode de phénotypage à grande échelle.

Enfin, l'approche transcriptomique visant à identifier des mécanismes biologiques et moléculaires de la réaction et de l'adaptation d'*O. oeni* au vin a été employée. Le but était de voir l'effet du stress sur la transcription des gènes, et d'en déduire des gènes codant pour des fonctions importantes pour la survie. Cette étude a montré la variation dans la transcription de certains gènes selon les souches. En somme, l'objectif est d'évaluer et de comprendre la diversité globale de cette espèce, ce qui au plan pratique pourrait se traduire par un progrès dans la sélection des souches.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Vinification et microbiologie du vin

1.1. La vinification

1.1.1. Du raisin au moût

La vinification est un long processus comprenant de nombreuses étapes, qui aboutit à la transformation du raisin en vin. La définition communément admise du vin est « le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisin » (Ribéreau-Gayon, 1991).

Le raisin, matière première pour l'élaboration du vin, est le fruit d'une espèce unique, la seule à être cultivée, *Vitis vinifera*. De nombreuses variétés de cette espèce, appelées également cépages, sont utilisées, cépages qui diffèrent d'un pays à un autre, ou encore d'une région à une autre. Ainsi, dans la région bordelaise, les principaux cépages de raisins rouges utilisés sont le Merlot, le Cabernet-franc, le Cabernet-Sauvignon, et le Petit-Verdot alors qu'en Bourgogne il s'agit du pinot noir. En Champagne, les cépages sont le Chardonnay, le Pinot noir et le Pinot Meunier.

La date des vendanges est très importante, car de la maturité du raisin dépend la composition du milieu dans lequel évoluent les microorganismes. Elle est très liée aux conditions climatiques, qui d'une part influencent la qualité des baies, mais aussi la flore microbienne présente sur la baie de raisin. Tous ces facteurs vont finalement conditionner la qualité du vin. L'égrappage et le foulage des baies de raisin conduisent au moût, généralement additionné de dioxyde de soufre (SO₂), utilisé pour ses activités antioxydantes et antimicrobiennes. Le moût est finalement mis en cuve, pour y subir la fermentation alcoolique.

1.1.2. La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique (FA) consiste principalement en la dégradation du sucre du moût et la production d'éthanol et de dioxyde de carbone. Au delà de cette réaction, d'innombrables autres voies métaboliques transforment complètement le milieu. Différentes opérations techniques assurent l'homogénéisation du moût, l'oxygénation nécessaire aux levures et l'extraction des composés de la couleur des vins (Visser et al., 1990). Les sucres les plus abondants sont le glucose et le fructose. L'espèce de levure principalement responsable de la fermentation alcoolique est *Saccharomyces cerevisiae*, naturellement présente sur la baie de raisin (Mortimer et Polsinelli, 1999), mais de nombreuses autres espèces sont également actives, au moins en début de FA. C'est le cas par exemple de *Torulaspora delbrückii* qui participe à cette fermentation, avec des effets intéressants, de sorte qu'elle est préconisée comme complément à *S. cerevisiae* (Renault et al., 2009). La voie métabolique utilisée pour la consommation de sucres, en condition anaérobie, qui comporte la glycolyse, produit dans cette étape deux molécules d'ATP pour une molécule de sucre consommé. Durant cette réaction, deux molécules de cofacteur NAD^+ sont réduits en NADH. La production d'éthanol à partir du pyruvate de la glycolyse est la conséquence de la réoxydation de ces cofacteurs, nécessaires à la poursuite de l'activité glycolytique.

Lors de la fermentation alcoolique, la macération provoque l'extraction de la couleur et des tannins contenus dans le marc, constituée de composés solides du moût. A la fin de la fermentation, le moût est séparé du marc et placé dans un autre contenant, afin de réaliser la fermentation malolactique.

1.1.3. La fermentation malolactique

La fermentation malolactique (FML) est l'étape suivant la fermentation alcoolique. Elle correspond à la transformation de l'acide L-malique, en acide L-lactique, catabolisée par l'enzyme malolactique (Schütz et Radler, 1973; Lonvaud, 1975). La FML est principalement

réalisée par les bactéries lactiques de l'espèce *O. oeni*. Parmi les autres bactéries du vin, *O. oeni* survit le mieux dans les conditions acides, aux concentrations élevées en éthanol et autres éléments inhibiteurs à ce stade de la vinification. La FML ne se déclenche que si la concentration en *O. oeni* dépasse le seuil de 10^6 UFC/ml. La FML entraîne une désacidification du vin, ainsi que d'autres modifications organoleptiques et participe à la stabilisation microbienne (Lonvaud-Funel, 1999). Cette transformation entraîne une désacidification du vin, ainsi qu'une modification des qualités organoleptiques du vin. L'acide lactique est connu pour être moins agressif et moins désagréable en bouche que l'acide malique (de Revel et al., 1999). Les modifications organoleptiques ont pour origine divers métabolismes, et s'exercent sur de nombreux substrats du milieu. Beaucoup de bactéries lactiques, dont *O. oeni*, métabolisent le citrate, conduisant à l'acide acétique, l'acétoïne, le butanediol, ou bien encore le diacétyle, qui donne une note beurrée au vin (Lonvaud-Funel et al., 1984; Collins, 1972; de Revel et al., 1999; Bertrand et al., 1984; Davis et al., 1985).

Après la FML, le vin conservé en cuve et mis en barrique, afin d'évoluer sous l'influence de l'oxydation, et du contact avec le bois. Pendant cette période, il est stabilisé par sulfitage afin qu'aucun microorganisme ne se multiplie.

1.2. Les microorganismes du vin

Les microorganismes du vin sont présents initialement sur la baie de raisin, et se retrouvent dans le moût après le foulage. Ils appartiennent à différentes espèces de levures et de bactéries. À partir des nombreuses familles de bactéries et de levures présentes initialement dans le moût, peu d'entre elles parviennent à survivre et à se développer.

Espèce de bactérie lactique	Caractère fermentaire	Morphologie
<i>Lactobacillus casei</i>	hétérofermentaires facultatifs	bacilles
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactobacillus brevis</i>	hétérofermentaires obligatoires	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		
<i>Pediococcus damnosus</i>	homofermentaire	coques
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
<i>Oenococcus oeni</i>	hétérofermentaires obligatoires	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		

Tableau 1 : Liste des espèces de bactéries lactiques présentes sur la baie de raisin, et dans le vin (Ribereau Gayon et al 1998)

1.2.1. Les levures

Les levures présentes dans le vin appartiennent à différents genres dont le genre *Saccharomyces* est le plus important. Dans ce genre, l'espèce *Saccharomyces. cerevisiae* est majoritaire durant la fermentation alcoolique, mais *Saccharomyces. uvarum* domine dans certains cas. Dans les autres genres « non *Saccharomyces* » (Zott et al., 2008), certaines espèces participent à la fermentation. D'autres sont impliquées dans des altérations du vin, c'est le cas de *Brettanomyces bruxellensis* provoquant des déviations aromatiques et de *Zygosaccharomyces bailii* et *Saccharomycodes ludwigii* qui entraînent par exemple des refermentations de vins liquoreux (Renouf, 2006). D'un autre côté, des levures du genre *Candida*, *Hanseniaspora*, et *Pichia* peuvent contribuer favorablement à la typicité des vins (Jolly et al., 2003; Romano et Suzzi, 1993).

1.2.2. Bactéries lactiques

Parmi les bactéries présentes dans le moût de raisin, les bactéries lactiques représentent une part importante du microbiote. Les principales espèces de bactéries lactiques appartiennent aux quatre genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*. Ces quatre genres ont des capacités fermentaires variées (tableau 1) (Ribereau-Gayon et al., 1998). Les bactéries lactiques, capables de survivre en environnement anaérobie, se trouvent dans d'autres aliments et réalisent la fermentation de nombreux produits comme les fromages et produits laitiers, mais également dans des viandes (charcuterie) ou des végétaux (choucroute). Elles influent d'une part sur les qualités organoleptiques des produits, mais jouent également un rôle fondamental dans la stabilité microbienne et la conservation des produits (Morgan et al., 2002).

Les bactéries lactiques du vin sont indispensables à l'élaboration du vin, où à côté des apports organoleptiques de la fermentation malolactique, elles aident à la stabilisation microbienne du vin. En effet, elles consomment des substrats tels que l'acide malique, et

certaines sont capables de produire des bactériocines (Knoll et al., 2008; Navarro et al., 2000; Strasser de Saad et Manca de Nadra, 1993). Parmi les bactéries lactiques, l'espèce *O. oeni* prédomine largement durant la fermentation malolactique, car elle possède une très bonne faculté d'adaptation dans le vin, et est la plus apte à réaliser la FML (Lonvaud-Funel, 1999).

1.2.3. Bactéries acétiques

Deux genres principaux de bactéries acétiques sont retrouvés dans le vin, *Gluconobacter* et *Acetobacter*. Certaines espèces, principalement *Acetobacter aceti* et *Acetobacter pasteurianus*, interviennent dans le vin fini et oxydent l'éthanol en acide acétique, provoquant une augmentation de l'acidité volatile du vin. Ce phénomène qui altère la qualité du vin est évité au maximum en œnologie, mais il est au contraire recherché lors de l'élaboration du vinaigre.

1.2.4. Evolution du microbiote durant la vinification

Le biote microbien évolue continuellement, depuis l'environnement de la baie de raisin jusqu'au vin mis en bouteille. La cause principale est la modification des conditions physico-chimiques du milieu, qui change tout au long de la vinification. Ainsi, les différentes espèces se succèdent, plus ou moins bien adaptées aux conditions, richesse en sucres d'abord, puis carence, et avec une augmentation de la concentration en éthanol. Ces modifications du microbiote sont importantes car elles conditionnent le bon déroulement de la vinification.

D'abord, la majeure partie des espèces présentes sur la baie de raisin, les espèces non fermentaires, laissent la place aux espèces fermentaires mieux adaptées aux conditions plus difficiles (Renouf, 2006). Parmi les espèces bactériennes, une grande partie de la biodiversité est composée de bactéries lactiques, dont l'espèce *O. oeni*, à de très faibles concentrations.

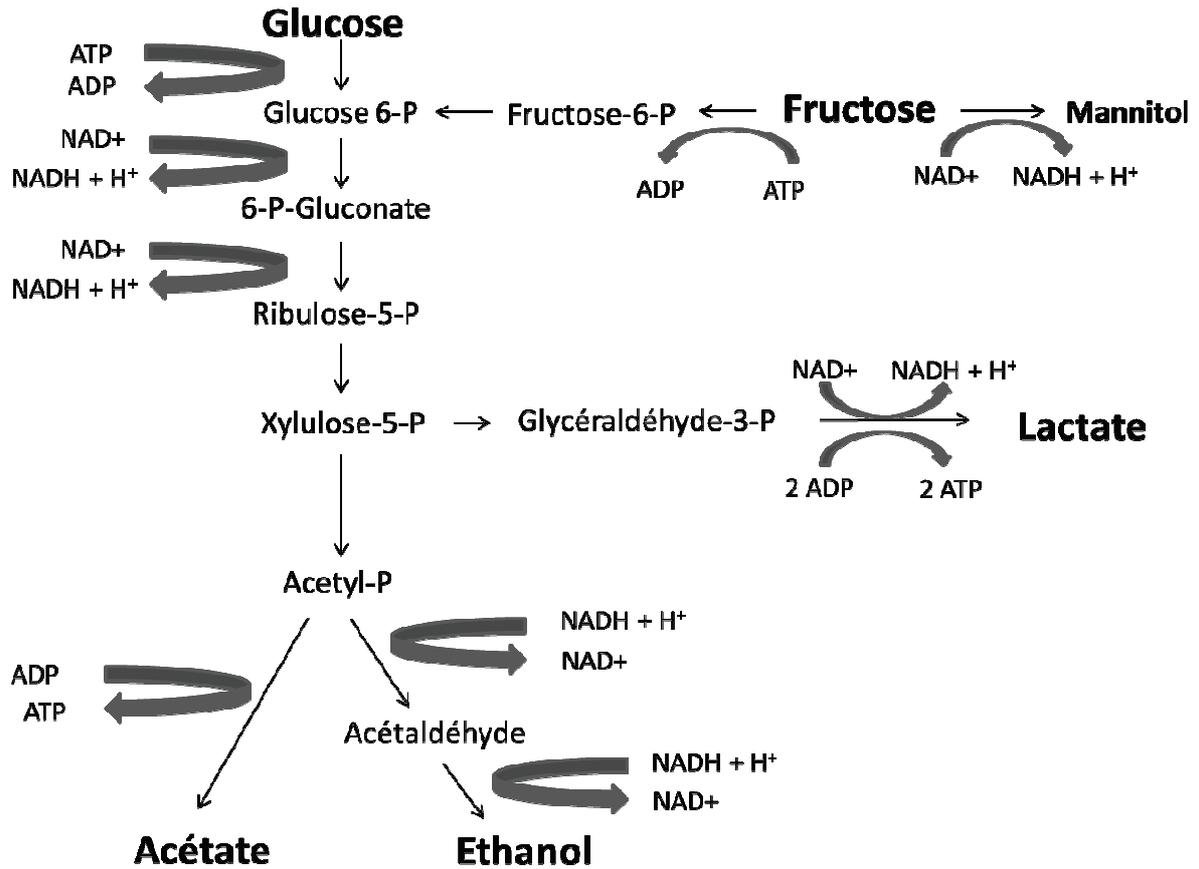


Figure 1: Voie de la fermentation du glucose et du fructose chez les bactéries lactiques hétérofermentaires, chez *O. oeni*. Les produits finaux (lactate, acétate, éthanol) sont indiqués en gras.

Au fur et à mesure de la fermentation alcoolique, la diversité microbienne chute, avec seules les espèces les plus résistantes. Durant la FA, *S. cerevisiae* atteint des concentrations de l'ordre de 10^8 c/ml dans le moût, mais les bactéries lactiques survivent à des concentrations de 10^3 - 10^4 UFC/ml. Leur croissance est affectée par le métabolisme des levures qui libère des molécules antibactériennes et appauvrit le moût en sucres, acides aminés, vitamines et autres facteurs de croissance (Lafon-Lafourcade, 1983; King et Beelman, 1986; Lonvaud-Funel et Joyeux, 1988). En fin de fermentation alcoolique, la faible teneur en sucre, l'accumulation de molécules toxiques, et les carences provoquent le déclin de la population de levures.

C'est dans ces conditions difficiles que la population bactérienne commence à proliférer, essentiellement *O. oeni*, la mieux adaptée au vin. A ce moment-là, le milieu est pauvre en sucres, riche en éthanol, et l'acidité s'ajoute pour sélectionner cette espèce, qui compose alors 70% à 100% de la flore bactérienne lors de la FML. La dégradation massive d'acide malique est visible et effective uniquement lorsque la population atteint la concentration de 10^6 UFC/ml.

Enfin, après la FML, la population microbienne est éliminée par sulfitage. Certaines souches de plusieurs espèces de bactéries et de levures arrivent cependant à survivre, souvent trop peu nombreuses pour proliférer. C'est le cas notamment de *Brettanomyces bruxellensis* ou encore certaines souches de *Pediococcus parvulus*, qui altèrent le vin si elles arrivent à se développer suffisamment.

2. *Oenococcus oeni*

2.1. Description l'espèce *Oenococcus oeni*

Oenococcus oeni est une bactérie à gram positif dont les cellules arrondies forment des chainettes plus ou moins longues selon les souches et les conditions du milieu. Présente initialement sur la baie de raisin, elle passe inaperçue car sa population est très faible. Il a

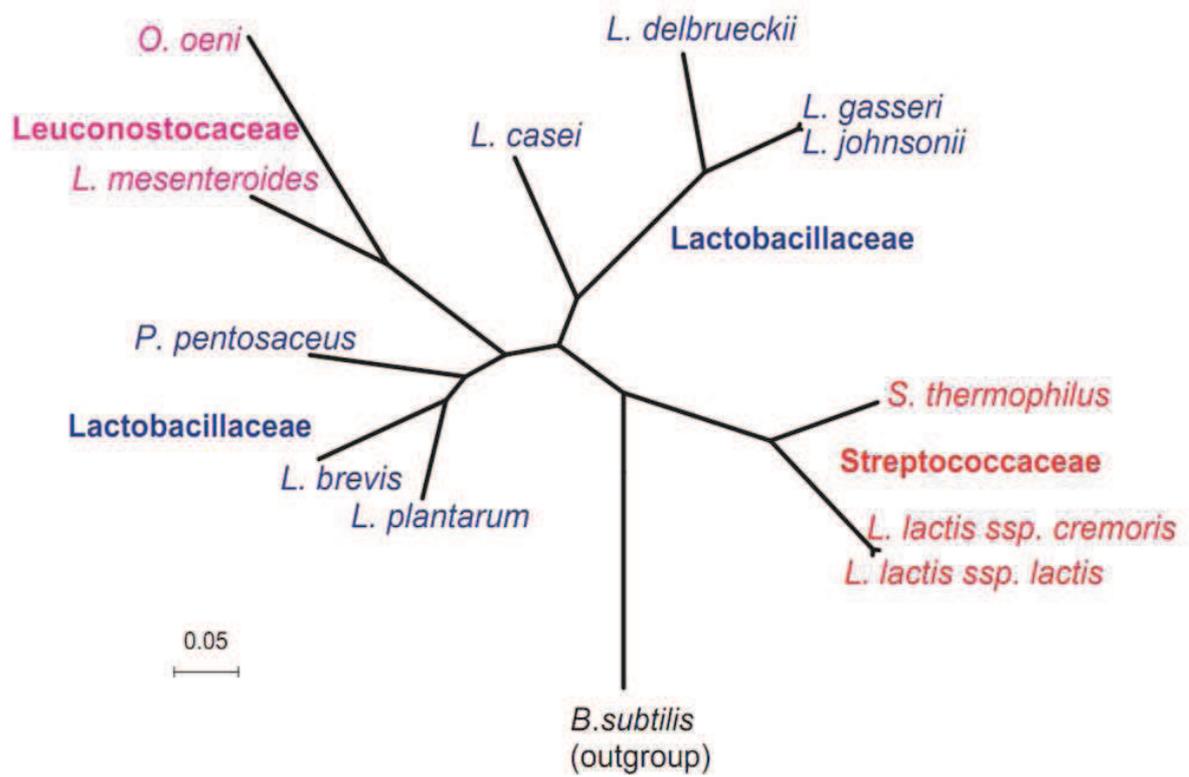


Figure 2 : arbre phylogénétique des bactéries lactiques, construit à partir de la séquence des protéines ribosomales. Chaque branche présente des valeurs de bootstrap supérieures à 75% (Makarova et al 2006)

ainsi fallu passer par des étapes d'enrichissement pour l'observer (Renouf et al., 2007). *O. oeni* se retrouve également sur d'autres fruits comme la pomme et la poire. Elle participe aussi au processus de l'élaboration du cidre et du poiré.

O. oeni est une bactérie hétérofermentaire (Figure 1). Elle dégrade le glucose par la voie des pentoses phosphates et qui aboutit à la formation d'acide lactique, d'acide acétique, d'éthanol et de CO₂ (Kandler, 1983). Le fructose et divers pentoses sont également fermentés. Lorsque le fructose est métabolisé, une partie est fermentée et l'autre est réduite en mannitol. Dans ce cas, la production d'éthanol est limitée car le NADH nécessaire est déjà réoxydé par la réaction de production du mannitol (Richter et al., 2003).

L'espèce *O. oeni* était initialement classée dans le genre *Leuconostoc*, et appelée *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967). Cependant, très tôt, de nombreuses études ont montré la différence importante entre l'espèce *L. oenos* et les autres *Leuconostoc* (figure 2). Notamment cette espèce était caractérisée par son acidophilie (Garvie et Farrow, 1980). En outre, elle ne possède pas de glucose-6-phosphate déshydrogénase NADH dépendante (Garvie, 1986), et présente un profil électrophorétique des protéines solubles différent des autres *Leuconostoc* (Dicks et al., 1990). Par ailleurs, les études portant sur l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN ont également montré des différences majeures (Garvie, 1976, 1981; Hontebeyrie et Gasser, 1977; Farrow et al., 1989; Schillinger et al., 1989; Dicks et al., 1990), ainsi que l'étude des séquences des ARNs 16S et 23S. Pour toutes ces raisons, les bactéries classées comme *L. oenos* ont été intégrées dans un nouveau genre *Oenococcus*, composé à l'origine d'une seule espèce, *O. oeni* (Dicks et al., 1995). En 2006, une deuxième espèce appartenant au genre *Oenococcus* a été découverte, et nommée *Oenococcus kitaharae* (Endo et Okada, 2006). Cette espèce a été isolée de résidus de fermentation d'un alcool japonais, le shochu. Bien qu'ayant des caractères phénotypiques très différents d'*O. oeni*, elle fait partie du genre en raison de la similarité des ARNs 16S et d'un pourcentage d'hybridation ADN/ADN avec *O. oeni* de 25-30%.

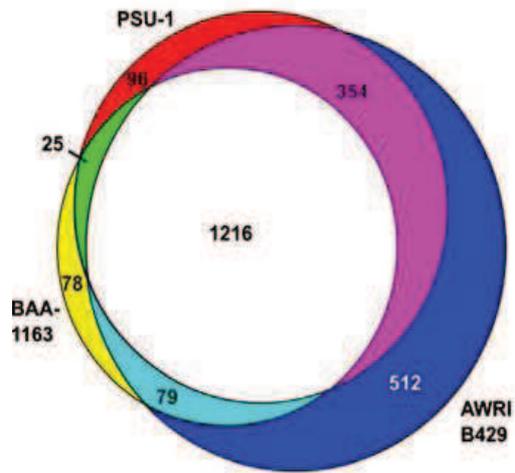


Figure 3 : Core et pangénome d'*O. oeni*. La comparaison des génomes des trois souches a été représentée sous forme du nombre de gènes spécifiques, ou présents conjointement chez plusieurs souches. L'aire de chaque région du graphe est proportionnel au nombre d'ORFs

Une particularité intéressante des deux espèces du genre *Oenococcus* est l'absence de deux gènes, *mutS* et *mutL* (Marcobal et al., 2008), codant pour des enzymes impliquées dans un mécanisme de réparation de l'ADN (Mutation Mismatch Repair). Cette délétion est assez rare dans le monde bactérien et a été rattachée à chaque fois à une augmentation de la fréquence de mutations et de transferts horizontaux au sein de l'espèce (Young et Ornston, 2001; Prunier et Leclercq, 2005; Rayssiguier et al., 1989; Matic et al., 1995). Chez *O. oeni*, le taux de mutations spontanées est effectivement beaucoup plus élevé que chez d'autres espèces de bactéries lactiques (Marcobal et al., 2008). L'absence de MMR chez le genre *Oenococcus* est ainsi une hypothèse qui explique que ce genre se soit distinct des autres *Leuconostoc*.

A ce jour, les génomes de trois souches d'*O. oeni* ont été séquencés, les souches PSU1 (Mills et al., 2005), ATCC BAA 1163 (n° genbank : AAUV01000000) et AWRIB429 (Borneman et al., 2010). La comparaison des séquences de ces trois souches a montré que le pangénome d'*O. oeni* était important. Sur plus de 2244 gènes identifiés, seulement 1216 étaient communs aux trois génomes (Borneman et al., 2010) figure 3. Des réarrangements chromosomiques ont été relevés, signes de la grande plasticité du génome d'*O. oeni*, et de sa grande variabilité génétique (Bon et al., 2009).

2.2. Utilisation de levains d'*Oenococcus oeni*

Le rôle prépondérant d'*O. oeni* dans la vinification a entraîné son utilisation de plus en plus fréquente sous forme de levains malolactiques. Les premières expérimentations d'ajout de souches exogènes dans le vin datent des années 1960 (Peynaud et Domercq, 1959), mais son utilisation est maintenant plus courante. Les levains sont utilisés en général pour compenser l'absence des souches d'*O. oeni* indigènes, et favoriser la FML. Actuellement, une dizaine de levains sont commercialisés par les industriels. Ils sont sélectionnés seulement sur des critères de survie et de croissance dans le vin.

2.3. Variabilité génétique chez *Oenococcus oeni*

La diversité génétique de l'espèce *O. oeni* a déjà été étudiée, avec des approches fondamentalement différentes. Ces études ont surtout pour but de distinguer les souches entre elles, et d'observer le polymorphisme génétique des bactéries de cette espèce.

2.3.1. Etude de l'ADN ribosomal

L'étude et le séquençage de l'ADN ribosomal est couramment utilisé afin de différencier les espèces. Cette séquence est choisie pour son ubiquité chez le vivant, et un faible polymorphisme qui différencie des espèces génétiquement très éloignées, et très proches. L'ADNr 16S a été la base d'une étude visant à classer l'ensemble des espèces bactériennes et des archées (Yarza et al., 2008). Le séquençage d'une partie de l'ARN ribosomique (ADNr 16S, 23S et espace intergénique 16S-23S) de *O. oeni* permet de différencier cette espèce des autres bactéries lactiques. Toutefois, le polymorphisme n'est pas suffisant pour discriminer des souches (Yang et Woese, 1989; Martinez-Murcia et al., 1993; Martinez-Murcia et Collins, 1990; Zavaleta et al., 1996; Le Jeune et Lonvaud-Funel, 1997). La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), par digestion enzymatique de la région 16S-23S n'a pas non plus permis de différencier les souches, puisqu'un profil de restriction unique a été observé (Viti et al., 1996; Zavaleta et al., 1996). Cependant, les souches ont pu être classées en deux groupes grâce à la technique de ribotyping, consistant en la digestion du génome total et l'utilisation d'une sonde spécifique à l'ADNr 16S (De Las Rivas et al., 2004; Zavaleta et al., 1997). Deux profils différents ont été obtenus et préfigurent déjà la séparation de l'espèce en deux sous-ensembles.

2.3.2. RAPD et AFLP

D'autres techniques ont été employées afin de tenter de discriminer les souches de l'espèce, basées sur une amplification de régions du génome. La RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA), est basée sur l'amplification de séquences à partir d'amorces aspécifiques. Mais l'ensemble des publications donnent des résultats très hétérogènes, puisque si certaines concluent à une grande diversité (Reguant et Bordons, 2003; Reguant et al., 2005; Zapparoli et al., 2000), d'autres ont montré un polymorphisme très faible (Zavaleta et al., 1997; Lechiancole et al., 2006).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), a également permis de discriminer les souches (Cappello et al., 2008). Cette technique est basée sur une digestion du génome, puis une amplification par PCR spécifique d'adaptateurs fixés aux extrémités des fragments de digestion. Elle donne des profils différents, mais pas suffisamment pour pouvoir discriminer une collection importante.

2.3.3. REA-PFGE

La méthode REA-PFGE (Restriction Electrophoresis Analysis - Pulsed Field Gel Electrophoresis) est une analyse de profils créés par la digestion du génome par une enzyme à site de restriction rare. Habituellement l'enzyme *NotI* est utilisée. Elle permet d'obtenir des profils de digestion allant jusqu'à une quinzaine de bandes. Cette technique s'est avéré la plus efficace pour typer les souches, elle est jusqu'ici la plus reproductible et est très employée (Daniel et al., 1993; Lamoureux et al., 1993; Kelly et al., 1993; Tenreiro et al., 1994; Zapparoli et al., 2000; Sato et al., 2001; Guerrini et al., 2003; Malacrinò et al., 2003; Lechiancole et al., 2006; Larisika et al., 2008; López et al., 2007; Bilhere et al., 2009). Cette technique, en plus de confirmer la grande diversité génétique de l'espèce, a notamment confirmé la répartition de la population en deux groupes suggérée par les études par RFLP (Bilhere et al., 2009).

2.3.4. MLST (Multilocus Sequence Typing)

La MLST est devenu une méthode de référence pour typer les bactéries (Enright et Spratt, 1999; Maiden et al., 1998). Elle consiste à séquencer plusieurs loci, généralement des « gènes de ménage », et à analyser la séquence concaténée. Un gène dit « de ménage » est un gène qui s'exprime dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des [cellules](#). Le choix des gènes est très important, et l'utilisation des gènes de ménage se justifie par leur ubiquité dans l'espèce bactérienne, et une relative conservation de séquence. Le nombre de gènes étudiés doit être au moins de 7, et ces gènes doivent être répartis sur l'ensemble du génome. Ils doivent présenter un polymorphisme suffisant mais pas trop important afin d'éviter d'obtenir un profil unique par souche. Cette technique est très différente du typage REA-PFGE. En effet, cette dernière permet l'observation de grands réarrangements chromosomiques, d'évènements de délétion ou insertion de matériel chromosomique, alors que la MLST permet d'observer la diversité neutre de l'espèce, et la présence de SNP (single nucleic polymorphism).

Deux études sur *O. oeni* ont déjà été menées en utilisant cette méthode, avec à chaque fois un nombre de souches relativement limité. La première étude a porté sur le séquençage de quatre gènes de ménage chez 18 souches (De Las Rivas et al., 2004). Elle différencie toutes les souches de l'étude. Elle décrit une population très hétérogène, avec une espèce panmictique. Cependant, le faible nombre de loci analysés et de souches utilisées ne permet pas de certifier ces hypothèses.

Une deuxième étude, réalisée sur une collection de 43 souches et huit loci, a montré également un fort polymorphisme et une bonne discrimination de souches. 34 profils différents ont été obtenus, avec une population séparée en deux groupes distincts, et une recombinaison intragénique importante responsable de la formation de sous-groupes (Bilhère et al., 2009). Dans cette étude, le pouvoir discriminant de la MLST et de la PFGE. Elle montre une meilleure performance de la méthode PFGE ont été comparés. Ces deux

techniques s'accordent sur l'existence de groupes génétiques spécifiques, bien que les approches soient très différentes.

2.4. Variabilité phénotypique

O. oeni présente un caractère particulier, décrit dans de nombreuses revues. C'est une espèce acidophile, pouvant survivre et se développer dans des milieux très difficiles, à hautes concentrations en éthanol (12%). Ces bactéries se développent mieux dans un milieu contenant de l'éthanol (6%) que dans un milieu sans éthanol (Guerzoni et al., 1995). Cependant, même si l'ensemble des souches possèdent plus ou moins ces caractéristiques, la variabilité phénotypique est vraiment importante (Edwards et al., 1991; Tracey et Britz, 1987). En particulier, les souches n'ont pas la même capacité d'adaptation au vin, et donc pas la même capacité à réaliser la fermentation malolactique. La capacité de dégradation du malate dans le vin est aussi variable selon les souches (Beelman et al., 1980; Henick-Kling et al., 1989; Rodriguez et al., 1990; Martineau et Henick-Kling, 1995; Avedovech et al., 1992). La diversité a pu être montrée sur un panel de 79 souches et a pu ainsi démontrer une grande variété de phénotypes différents (Bon et al., 2009), et une association a pu être trouvée entre les meilleures souches et la présence de marqueurs génétiques. Il a également été démontré de nombreuses activités glycosidases au sein de l'espèce (Ugliano et al., 2003; Barbagallo, 2004; D'Incecco, 2004; Grimaldi et al., 2005), alors que l'hétérogénéité de croissance de plusieurs souches a été montrée dans des vins italiens (Cappello et al., 2010; Guerrini et al., 2003; Vigentini et al., 2009). Il manque cependant une étude claire et portant sur une collection exhaustive pour pouvoir évaluer vraiment la diversité de phénotypes qu'il est possible de rencontrer chez cette espèce.

3. Adaptation et réponse aux chocs environnementaux

L'étude de la réponse des bactéries au stress est très étudiée ces dernières années, car les mécanismes d'adaptation sont mal connus et intéressent les industriels. En effet, l'industrie alimentaire fait largement appel aux microorganismes, qui sont soumis à des contraintes diverses. La sélection et l'utilisation de souches plus performantes car plus adaptées à l'environnement, passe par la compréhension des mécanismes de survie et de résistance au stress. Parmi les microorganismes, les bactéries lactiques sont activement étudiées de ce point de vue, car elles sont très utilisées en agroalimentaire. Dans le vin, les microorganismes, notamment *O. oeni* sont soumis à des conditions difficiles pendant la vinification. Au cours de la FA, l'augmentation de la concentration en éthanol et en métabolites toxiques des levures s'ajoute à l'acidité et autres inhibiteurs du vin (polyphénols,...). Les bactéries doivent avoir les mécanismes adéquats pour s'y adapter. Par ailleurs, concernant les levains malolactiques, les bactéries sélectionnées doivent s'adapter aux contraintes de la production industrielle (production de biomasse, lyophilisation), puis aux chocs de l'inoculation dans le vin au moment de l'utilisation.

Les phénomènes de stress ne sont pas spécifiques aux conditions industrielles, mais sont existants aussi dans l'environnement, et par exemple pour *O. oeni* sur le raisin. Les mécanismes de réponse sont très variés d'un stress à un autre et font ainsi intervenir aussi bien des modifications de métabolisme que des variations de composition de membranes, ou encore l'intervention de transporteurs et la formation de biofilms.

3.1. Le stress chez les bactéries

3.1.1. Définition

Le stress en microbiologie est défini de la façon suivante. C'est une brusque modification de l'homéostasie cellulaire, induite par une ou plusieurs modifications

environnementales. Une définition plus précise, émise par Booth (Booth, 2002), décrit le stress comme « toute modification dans le génome, le protéome ou dans l'environnement, qui provoque une croissance réduite ou affecte la capacité à survivre. De telles modifications conduisent la cellule à tenter de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à la survie, ou bien à une croissance plus rapide ». En plus des mécanismes de réponse au stress, un autre facteur important est l'état physiologique dans lequel les cellules se trouvent. Les cellules en phase stationnaire acquièrent un niveau général de résistance au stress supérieur aux cellules en croissance (Martin et al., 1991). L'entrée en phase stationnaire induit des systèmes de réponse qui préparent les cellules à survivre à différents stress environnementaux, sans qu'elles n'y aient été nécessairement préparées (Jenkins et al., 1990, 1988; Jouper-Jaan et al., 1992; Hartke et al., 1994; Giard et al., 1996). Chez *O. oeni*, on sait que les souches de laboratoire incapables de survivre dans un vin, peuvent être réadaptées après culture dans des milieux plus proches du vin (Renouf, 2006).

3.1.2. La réponse au stress

La réponse au stress est diverse selon les stress. En général, les bactéries préviennent les stress plutôt qu'elles ne les réparent (Hengge-Aronis, 2002). Les bactéries ont de multiples systèmes protégeant la cellule des contraintes extérieures. La membrane est la première cible et doit maintenir son activité et son intégrité. Elle est en particulier le siège des transports sélectifs qui permettent de conserver l'homéostasie cellulaire, en premier lieu pour des bactéries fonctionnant en milieu acide avec le maintien du pH intracellulaire. Après détection du signal de stress, la transcription de gènes est activée ou réprimée, pour une réponse adaptée. Chaque type de stress entraîne une réponse spécifique.

Si le stress est trop important par rapport à la réponse possible, la cellule ne peut pas survivre. Sinon elle s'adapte, c'est-à-dire qu'elle met en place ses mécanismes de défense, qui lui permettent de se développer et de proliférer. Un état physiologique particulier est l'état

viable non cultivable (VNC), où les cellules métaboliquement actives ne sont plus capables de se développer (Kogure et al., 1979; Xu et al., 1982).

Mais une culture bactérienne n'est pas complètement homogène. Aertsen et Michiels (2005) démontrent que l'augmentation de diversité d'une espèce est directement liée à la capacité de survie au stress. Plus une espèce est génétiquement diverse, plus il y a de chance pour qu'un individu de la colonie soit capable de résister à un stress. C'est une autre hypothèse, non plus basée sur les mécanismes physiques mais plus sur la sélection naturelle. Associée aux autres mécanismes, elle peut être appliquée à *O. oeni*, connue pour être plus génétiquement variable que les autres bactéries peut-être soumises à des contraintes moins fortes (Marcobal et al., 2008).

3.2. Les types de stress

3.2.1. « Stress prolongé »

Lors d'un « stress prolongé », la bactérie est incubée dans un milieu et des conditions hostiles. On peut étudier l'adaptation progressive de la bactérie dans la durée. La concentration bactérienne est mesurée en fonction du temps. Il est ainsi possible de construire des courbes de croissance (Mellefont et al., 2003), mettant en évidence le temps de latence et donnant une quantité totale de biomasse formée, pour évaluer l'impact du stress.

3.2.2. Stress de type choc

Lors d'un choc, le stress intense et non létal est de courte durée. Il s'agit-là d'observer la survie de la population bactérienne, après que la contrainte soit supprimée. Le dénombrement du nombre de cellules survivantes par rapport au nombre initial de cellules permet d'évaluer l'impact du stress.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur le taux de survie d'une population bactérienne après un choc : outre la souche elle-même, donc son espèce et genre, l'état physiologique est

très important (Kim et al., 1999). Lors d'un stress sur des cellules en phase exponentielle, des différences peuvent apparaître entre les cellules d'une même population. L'hypothèse est que les cellules d'une même culture ne sont pas toutes forcément dans un même état physiologique. Chacune possède un contenu protéique donné, et donc un niveau de résistance au stress létal différent (Kim et al., 2002). Par exemple, pour l'espèce *Lactococcus lactis*, un stress intense a amené la culture à une mortalité de 99,99% (Kim et al., 2002). Les cellules survivantes étaient toutes capables de croître en absence de stress, mais un stress effectué ultérieurement a montré que toutes les souches survivantes n'étaient pas capables de survivre à un nouveau stress. C'est donc la preuve que les cellules survivant à un premier stress ne possèdent donc pas toutes le même équipement de résistance. En plus de la diversité génétique au sein d'une population, l'hétérogénéité de l'état physiologique peut amener globalement la population à résister. Les cellules survivant à un stress présenteront à nouveau après culture des profils différents.

3.3. Vin et contraintes environnementales pour les bactéries

Le vin est un milieu très difficile pour la croissance des microorganismes, alors que le moût de raisin est initialement riche, et propice à la croissance de nombreuses espèces microbiennes. Les conditions changent à mesure que la vinification avance et nécessitent une adaptation. Les bactéries et les levures dont les génomes sont dotés des éléments de régulation de transcription adéquats subissent ces adaptations tant que les paramètres le leur permettent.

- Acidité

Le pH dont la valeur varie de 3,0 à 4,0 au maximum, mais peut être inférieure à 3,0 dans certains vins de champagne, provoque une baisse de l'acidité intracellulaire des bactéries. Les acides diffusent plus ou moins dissociés à travers la membrane. Le pH interne trop acide cause des dommages sur les protéines (réductions des activités enzymatiques (Brul

et Coote, 1999)) ou encore sur l'ADN (dépurination et dépyrimidination) (van de Guchte et al., 2002). L'acidité affecte également la perméabilité sélective membranaire car les protéines ne sont plus dans les conditions optimales d'activité. Les inhibitions s'exercent sur toutes les fonctions enzymatiques de la membrane.

Les bactéries lactiques, c'est le cas en particulier pour *O. oeni*, modifient la composition de la membrane plasmique en réponse à un stress acide, par exemple de la composition en acides gras et en protéines. Cette modification de membrane est importante dans la résistance au stress chez *E. coli* (Chang et Cronan, 1999). Le maintien du pH intracellulaire utilise des protéines de transport de protons, et notamment la H⁺-ATPase. L'expression des gènes reliés à cette protéine sont fortement surexprimés chez *O. oeni*, en condition de stress acide (Fortier et al., 2003). De même, des mutants, présentant un défaut d'activité H⁺-ATPase ont une croissance ralentie en conditions acides (Tourdot-Maréchal et al., 1999). D'autres protéines de transport de cations peuvent être impliquées dans la résistance à l'acidité. La K⁺-ATPase, transporte en antiport un ion K⁺ avec un ion H⁺. Ce transport provoque un gradient de pH qui participe au maintien du pH intracellulaire (Dashper et Reynolds, 1992). La production de composés basiques est également utilisée par les microorganismes. Ainsi, dans les voies de l'arginine déiminase, la synthèse d'ions NH₄⁺ alcalinise le milieu. Ce comportement a notamment été observé chez *S. salivarius* (Chen et al., 2000). Le métabolisme de l'arginine, en présence de fructose, est également impliqué dans la résistance au stress chez *O. oeni* (Bourdineaud, 2006).

Enfin, la réaction de la FML est directement impliquée dans la tolérance au stress acide, dans le vin. Le L-lactate produit par la FML peut être excrété par un antiport lactate/malate (Poolman et al., 1991), ou un uniport électrogénique (*O. oeni*, *Lb plantarum*) et permet la synthèse d'ATP. Cet ATP formé est directement relié à la tolérance de la bactérie *O. oeni* au stress acide durant la FML (Tourdot-Maréchal et al., 1999).

- Ethanol

L'éthanol du vin est une importante source de stress pour les bactéries. Les concentrations, supérieures à 10%, et pouvant aller jusqu'à 15%, inhibent la croissance de nombreuses espèces bactériennes. *O. oeni* y est relativement tolérante, et une concentration de 6% d'éthanol est même bénéfique à sa croissance (Guerzoni et al., 1995). L'éthanol s'incorpore à la membrane plasmique, augmente la polarité, et favorise l'intégration de molécules amphiphiles, qui entraîne une altération de la fluidité membranaire (Ingram et Buttke, 1984). Il s'ensuit dans les cas extrêmes une perte du contenu cytoplasmique (Graca da Silveira et al., 2002).

Dans la résistance de la cellule à une concentration élevée en éthanol, plusieurs mécanismes sont mis en jeu, impliquant la modification de la composition de la membrane plasmique, notamment, la production de protéines chaperonnes, comme Lo18, qui interagissent avec les phospholipides, et augmentent la rigidité de la membrane (Coucheney et al., 2005). La bicouche lipidique est également ajustée en augmentant le ratio protéines/lipides (Garbay et Lonvaud-Funel, 1996; Da Silveira et al., 2003), ou en modifiant la nature et la structure de certains acides gras membranaires (Teixeira et al., 2002; Grandvalet et al., 2008)

- Le dioxyde de soufre

Lors de la vinification, une pratique consiste au sulfitage du moût. Le dioxyde de soufre (SO₂) est utilisé principalement comme antioxydant, mais l'activité bactéricide est également recherchée au début de la vinification pour limiter la compétition des bactéries avec les levures. Le SO₂ diffuse à travers la membrane et engendre, sous l'effet du pH intracellulaire une accumulation du SO₃²⁻, qui interagit avec les acides nucléiques, les protéines et certains cofacteurs, conduisant à une mortalité cellulaire (Romano et al., 1993).

Cette molécule inhibe également fortement l'activité de la H⁺ ATPase membranaire (Carreté et al., 2002).

Le SO₂ se retrouve sous deux formes chimiques différentes dans le vin, avec des propriétés différentes. Il se retrouve sous forme libre, ou combiné à des composés carbonylés, et ces différentes formes n'ont pas le même impact sur la croissance des bactéries. La forme libre est la plus toxique puisqu'elle devient létale pour *O. oeni* à partir d'une concentration de 15mg/l (Guzzo et al., 1998), alors que la forme combinée est moins toxique puisqu'aux mêmes concentrations, et jusqu'à 50mg/l, la croissance des bactéries est seulement ralentie, voire inhibée (Wibowo et al., 1985).

- Les carences nutritionnelles

Le stress de carence nutritionnelle est un des stress les plus communément rencontrés chez les microorganismes. Les nutriments manquants peuvent être les sucres, les phosphates (diminution des réserves énergétiques et problèmes dans la synthèse d'acides nucléiques), ou les composés azotés (limite la synthèse protéique). La plupart des bactéries lactiques survivent à ce genre de stress en maintenant à leur minimum leurs fonctions métaboliques. Par exemple, les lactocoques ont la capacité de maintenir leur activité glycolytique dans le cas d'une carence en hydrates de carbones, qui entraîne une meilleure survie (Poolman et al., 1987; Kunji et al., 1993). D'autres études ont mis en évidence la survie de *Lactococcus lactis* (Stuart et al., 1999), *O. oeni* (Tonon et Lonvaud-Funel, 2000), et *Lactobacillus sakei* (Champomier Vergès et al., 1999) à ces types de stress.

Dans le vin, durant la fermentation alcoolique, les sucres sont consommés en majorité par les levures. Toutefois, le besoin des bactéries est largement couvert par les sucres résiduels, de quelques centaines de mg/l à quelques g/l lorsqu'on inclut les hexoses, pentoses et autres molécules glycosylées. Les bactéries lactiques ne rencontrent véritablement de

carence que vis-à-vis d'acides aminés indispensables dont la concentration diminue fortement pendant la FA. Mais ils sont restitués en quantité et variété suffisante pendant l'autolyse des levures.

- Composés inhibiteurs

Certains constituants des vins sont toxiques et empêchent ou ralentissent la croissance des bactéries. Des acides gras (C8, C10, C12) sont produits par les levures durant la fermentation alcoolique et ont des effets antimicrobiens (Edwards et al., 1990; Lonvaud-Funel et al., 1988). Ils s'intègrent dans la membrane plasmique en raison de leur caractère hydrophobe, désorganisant la structure de la membrane, et altèrent la perméabilité sélective (Stevens et Hofmeyr, 1993). Des protéines peuvent aussi avoir des propriétés antimicrobiennes. Ainsi, des levures produisent des peptides dont les capacités s'apparentent au lysozyme (Dick et al., 1992). Les composés phénoliques, largement présents dans le vin et issus des raisins, ont un impact sur la croissance des bactéries lactiques. Cependant de nombreuses études ont montré que cette famille de molécules pouvaient avoir des influences diverses. En effet certains composés comme l'acide gallique, améliorent la croissance d'*O. oeni* (Vivas et al., 1995; Reguant et al., 2000), comme la catéchine (Reguant et al., 2000; Alberto et al., 2011). Certains composés au contraire inhibent les bactéries, comme les pyrocyanidines, l'acide vanillique et les tannins (Figueiredo et al., 2008; Vivas et al., 1995, 2000). Les flavonols et les stilbènes semblent également inhiber la croissance des bactéries lactiques du vin (García-Ruiz et al., 2011). Le mode d'action de ces composés reste encore mal connu, et les mécanismes de résistance ou d'adaptation restent à identifier plus précisément.

3.4. Réponse au stress de la bactérie *Oenococcus oeni*

Parmi les méthodes d'étude de la réponse au stress chez les bactéries, plusieurs approches sont possibles. L'étude de l'expression des gènes, est l'une d'elles. Elle peut être réalisée selon deux approches différentes. D'une part, il est possible de choisir des gènes susceptibles d'être impliqués dans la réponse au stress et de mesurer leur niveau d'expression lorsque la cellule est soumise à différents types de stress, à différents temps. L'autre méthode fait appel à la confection d'une « puce d'expression », où sera analysée l'expression de tous les gènes d'un génome ou d'un pangénome. Cette dernière est plus lourde à mettre en œuvre, mais elle fournit de nombreuses informations, et favorise la découverte de nouveaux gènes candidats pour la réponse au stress.

Plusieurs études sur la transcription de gènes chez *O. oeni* ont déjà été réalisées, mais seulement dans la vérification de l'expression de gènes cibles. La transcriptomique globale de certaines espèces de bactéries lactiques comme *L. casei* (Broadbent et al., 2010) ou *Lactobacillus reuteri* (Hüfner et al., 2008) a déjà été effectuée, mais il n'y a pas encore eu de puces d'expression réalisées chez *O. oeni*. La plupart des articles décrivent l'expression de gènes précis, déjà connus pour être impliqués dans la résistance aux stress chez les bactéries. Ainsi il a été montré que certains gènes étaient fortement surexprimés en condition de stress, comme les gènes *ftsH* (Bourdineaud et al., 2003), *trxA* (Jobin et al., 1999) et *clpP* (Beltramo et al., 2006). Un régulateur de transcription, *ctsR*, a également été découvert, ayant un rôle important dans la réponse globale au stress, puisqu'impliqué dans la régulation de nombreuses chaperonnes, comme le système *groESL*, ou des protéines de heat shock (Grandvalet et al., 2005). L'évolution du métabolisme du citrate a été également étudiée, avec une sur-expression de l'opéron en présence d'un stress à l'éthanol (Olguín et al., 2009).

Une étude a tenté de réunir de nombreux gènes de métabolisme, ou de gènes impliqués dans la réponse au stress, et a étudié l'expression de ces gènes chez *O. oeni*. Il en a résulté que la quasi-totalité de ces gènes, étaient surexprimés, à plus ou moins fort taux (Beltramo et al.,

2006). Une approche intéressante a montré pour ces mêmes gènes une différence d'expression chez les quatre souches utilisées, toutes ayant des comportements métaboliques différents. Cette étude est la première à mettre en évidence une variabilité de transcription en réponse au stress, chez l'espèce *O. oeni* (Olguín et al., 2010). Ces approches, bien qu'intéressantes, présentent quand même une limite. La majorité des gènes étudiés sont déjà connus pour être impliqués dans la réponse au stress chez d'autres bactéries, et leur rôle est relativement bien connu. Il est d'ailleurs tout à fait normal que ces gènes jouent un rôle important dans la résistance chez *O. oeni*, mais ils ne permettent pour l'instant pas d'avoir une vision plus large des mécanismes moléculaires, et des gènes de résistance spécifiques à cette espèce.

MATERIEL ET METHODES

1. Techniques de microbiologie

1.1. Etablissement de la collection d'*Oenococcus oeni*

Les souches utilisées lors de cette thèse sont issues de plusieurs collections de par le monde. La collection de 510 souches a été montée de façon à essayer de couvrir le plus possible la diversité de l'espèce *O. oeni*. Elle comporte toutefois en majorité des souches françaises (313) avec 87 souches issues de Champagne, 55 souches isolées en Bourgogne, et 41 provenant d'Aquitaine. Les souches des autres pays proviennent du Chili (46 souches), Afrique du Sud (33 souches), Italie (30 souches), Allemagne (27 souches), ainsi que des souches issues d'Espagne, des USA, d'Argentine, du Brésil, de Suisse, d'Australie, de Grèce, d'Autriche et du Portugal, avec des échantillonnages plus faibles (64 souches au total pour les 9 pays). Ces souches ont été isolées à partir de vin rouge (150 souches), vin blanc (43 souches), champagne, ou de vins fortifiés. Des souches issues de cidres (32 souches) et de fruits à noyaux (12 souches) ont également été incluses. Elles ont été isolées entre les années 1967 et 2008. L'ensemble de la collection a été typé par analyse en champ pulsé. A partir de ces résultats, une deuxième sélection de 282 souches a été effectuée, pour avoir la collection génétiquement la plus diverse, tout en diminuant le nombre pour la suite de l'étude par MLST. La liste complète des souches et leur origine est présentée dans l'index.

1.2. Culture des bactéries

Les bactéries ont été cultivées dans plusieurs milieux, selon les expériences effectuées. Généralement, le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (Man et al., 1960), nommé MRS, a été utilisé lors des précultures, pour obtenir du matériel biologique en quantité importante.

La composition du milieu est la suivante : Peptone 10 g/l, Extrait de viande 5 g/l, Extrait de levure 5 g/l, D(+)-Glucose 20 g/l, Phosphate de dipotassium 2 g/l, Citrate de diammonium 2 g/l, Acétate de sodium 5 g/l, Sulfate de magnésium 0,1 g/l, Sulfate de manganèse 0,05 g/l.

Le pH du milieu a été ajusté à 4,8 pour l'ensemble des précultures. Puis, le milieu a été stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15mn.

Dans certaines expérimentations, les bactéries ont été cultivées dans un milieu à base de jus de raisin. Il est composé de Jus de raisin à 250ml, 5g/l d'extrait de levure et 1ml de tween80 pour 1litre de milieu. Il a été utilisé en complément du milieu MRS car parfois mieux adapté à la croissance de certaines souches.

L'étude de la dégradation des sucres a été effectuée dans un milieu minimum, supplémenté avec les différents sucres : glucose, fructose, ribose, arabinose, galactose, mannose, maltose, saccharose, xylose.

Composition du milieu minimum : Casamino acids 10g/l, Acétate de sodium 3,4g/l, Phosphate de potassium 1g/l, Sulfate de Magnésium 100mg/l, Sulfate de manganèse 100mg/l, Bactotryptone 5g/l, Acide D-L malique 3g/l, Yeast nitrogen base 6,7g/l, Adénine, thymine, guanine, uracile 5mg/l, Sucre testé 5g/l

Le milieu témoin a été réalisé en remplaçant la solution de sucre à 5g/l par de l'eau stérile.

Pour les cultures sur milieu solide, les milieux ont été additionnés de 25g/l d'agar.

La culture effectuée dans du vin pour l'expérience de transcriptomique, l'a été faite dans un vin décoloré. Pour cela, 100ml de vin ont été mis en présence de 10g de charbon actif. Après quelques minutes, la solution a été filtrée sur des membranes 0.45µm pour éliminer le charbon. Puis, le vin décoloré obtenu a été filtré sur membrane 0.2µm pour stérilisation.

Les souches ont été stockées à une température de -80°C . Les cultures ont été récupérées en phase exponentielle de croissance, et mélangées à un tiers de volume de glycérol, pour empêcher la rupture des membranes cellulaires. La sortie des souches a été faite très simplement en inoculant avec un peu de culture gelée un milieu de culture.

1.3. Détermination de la concentration cellulaire d'une culture

Plusieurs techniques ont été utilisées durant ces travaux pour déterminer la concentration en bactéries d'une culture, ou d'un vin. Les principes sont très différents. Elles ne nécessitent pas les mêmes délais et renseignements, avec plus ou moins de précision sur l'état des bactéries.

- **Mesure de Densité optique**

Le nombre de cellules par millilitre de culture peut être estimé par mesure du trouble des suspensions à 600nm. L'absorbance mesurée pour une culture est proportionnelle à la concentration cellulaire. Le calcul de la population est fait par un étalonnage avec une suspension dont la concentration est déjà connue. Cette technique est peu onéreuse, très rapide à mettre en place, mais peu précise et ne permet de quantifier des cultures qu'à partir de 10^6 c/ml. Mais la technique ne permet pas de différencier les cellules vivantes des cellules mortes, qui absorbent de la même façon. C'est sur ce principe qu'a été faite la mesure de croissance de toutes les souches avec le robot de la plateforme phénotypage à haut débit

- **Dénombrement par culture sur gélose nutritive**

Le dénombrement de colonies sur milieu gélosé nutritif compte le nombre de bactéries viables et s'exprime en UFC/ml. Cette technique ne permet pas de compter les microorganismes non cultivables, notamment ceux en état viable mais non cultivable (VNC). La méthode consiste à étaler sur un milieu nutritif gélosé (à base de MRS ou de jus de raisin

supplémenté de 25g/l d'agar) un volume de culture ou de ses dilutions, la plupart du temps 100µl. l'étalement se fait à l'aide de billes de verre. Pour *O. oeni*, après une incubation en condition anaérobie, à 25°C, le nombre de colonies sur boîte est compté après 6 jours. Cette technique est beaucoup plus précise que la densité optique, et permet de quantifier des concentrations très basses, de l'ordre de 10^2 UFC/ml. Mais elle ne peut donner de résultats immédiats.

- **Dénombrement par épifluorescence**

La détermination par microscopie à épifluorescence compte le nombre de cellules vivantes, les cellules viables étant marquées et fluorescentes. Le kit utilisé a été développé par la société Chemunex. Un volume donné de culture, plus ou moins dilué, est filtré au travers d'une membrane (Chemfilter CB04), qui est mise à incuber en présence de 5µl de substrat (acétate de fluorescéine) et 500µl de tampon (Chemsol B16). La membrane imbibée de cette solution est incubée pendant trente minutes à 30°C, puis placée entre lame et lamelle, avec ajout d'une goutte d'huile et observée au microscope à épifluorescence.

Le substrat non fluorescent pénètre dans la bactérie où il est hydrolysé par une estérase qui libère la fluorescéine, qui fluoresce à une longueur d'onde de 480nm. Seules les cellules dont l'état physiologique permet l'activité enzymatique sont visibles. Elles sont comptées afin de déterminer la concentration en cellules viables de la culture de départ. A partir du chiffre obtenu par champs du microscope, le facteur multiplicateur est de 15625, qui correspond au nombre de champs couverts sur la membrane, et le facteur de dilution initialement effectué. Pour un dénombrement optimal, il est suggéré de compter entre 10 et 100 colonies par champ, ce qui correspond à une concentration cellulaire, après dilution de 10^5 - 10^6 cellules viables par ml. Cette technique a l'avantage d'être précise, et rapide à mettre en œuvre. Elle a une sensibilité d'environ 10^5 c/ml

- **Dénombrement par bioluminescence**

La technique de bioluminescence consiste à doser de la quantité d'ATP dans le milieu après lyse des cellules. Elle est directement corrélée à la population viable. Cette technique part du principe que la quantité d'ATP est identique dans chaque cellule d'une espèce, dans un même état physiologique. Le kit BacTiter-Glo de Promega a été utilisé. La culture cellulaire (diluée au dixième) a été mise en présence de substrat luciférine et de la luciférase pendant 5 minutes, avec un volume égal de culture cellulaire et de substrat (100µl), dans une plaque 96 puits opaque blanche, pour mieux réfléchir la lumière. Le tampon a pour effet de lyser les cellules et donc de libérer l'ATP intracellulaire. L'ATP libéré sert de substrat la réaction de la luciférase :

Luciférase



La réaction libère de la lumière quantifiée par le photomètre d'un lecteur de microplaque. Elle est exprimée en unités relatives de luminescence, ou RLU, corrélée à la concentration bactérienne. Une courbe étalon a été réalisée en parallèle, avec une souche dont la concentration était connue, par épifluorescence, et une gamme a été réalisée, sur plusieurs concentrations, afin de confirmer la linéarité de la technique. Cette technique offre l'avantage d'être moins onéreuse que l'épifluorescence, et plus précise et fiable que la mesure de densité optique. Elle permet de quantifier de façon fiable des cultures de 10^5 c/ml.

- **Mesure de la croissance sur une installation à haut débit**

Les 282 souches de la collection ont été mises en culture dans un milieu MRS dans lequel la concentration en éthanol et le pH ont été modifiés. Trois valeurs de pH ont été choisies : pH 4,8, pH 4, et pH 3,4. Trois valeurs de concentrations en éthanol ont été choisies :



Figure 4: Robots pipeteurs utilisés lors de l'étude phénotypique. Le robot a servi la distribution et au pipetage à haut débit des milieux, cultures, et mélanges réactionnels des tests enzymatiques

0%, 6% et 12% éthanol. La combinaison de ces paramètres permet d'obtenir neuf conditions différentes. Dans tous les milieux, de la pimarinine a été ajoutée, à une concentration de 0,5mg/ml, pour s'affranchir des problèmes de contamination fongique. Les 282 souches ont été ensemencées à une concentration de 10^6 cellules par ml. Pour cela, les précultures ont été ajustées à 10^7 cellules, comptées par bioluminescence. L'ensemencement a été réalisé dans des plaques 96 puits, de volume final 100 μ l, donc 10 μ l de culture dans 90 μ l de milieu, à l'aide d'un robot pipeteur Hamilton (figure 4). Le suivi de croissance a été réalisé en mesurant l'absorbance des cultures à 600nm, tous les deux jours. Pour chaque culture et condition de croissance, à partir de la courbe de croissance obtenue, une estimation de la valeur de biomasse totale formée a été calculée (calcul de l'aire sous la courbe), à l'aide de la méthode des trapèzes. Les souches ont pu être comparées d'une part par les valeurs de biomasse totale, et par le calcul du rapport à la condition témoin (pH 4,8 et 0% éthanol).

1.4. Etude de la fermentation des sucres

La capacité des souches de la collection à utiliser différents sucres a été étudiée dans le milieu minimum additionné de chacun d'eux. Le produit final de la voie métabolique commune à toutes les bactéries est l'acide lactique. Pour *O. oeni*, il s'agit de l'acide D-lactique. Les cultures où la fermentation avait lieu ont été repérées par la mesure de l'acide D-lactique formé après 15 jours d'incubation à 25°. La collection de 282 souches a été inoculée à 10^6 UFC/ml dans le milieu minimum, supplémenté de 5g/l des différents sucres. 10 milieux ont été testés : neuf contenaient un sucre, le glucose, le fructose, l'arabinose, le galactose, le mannose, le maltose, le saccharose, le ribose et le xylose. Le dernier n'a reçu que de l'eau stérile, pour servir de témoin.

Après culture, l'acide D-lactique est dosé par voie enzymatique. La mesure est réalisée en colorimétrie à 570nm par le couplage de réaction d'un sel de tétrazolium. La D-lactate déshydrogénase oxyde le D-lactate en pyruvate, en réduisant une molécule de NAD⁺ en

NADH. Le NADH ainsi formé réagit avec la phénazine éthosulfate (PES) et le sel de tétrazolium (MTT) pour donner du formazan, le composé coloré violet qui absorbe à 570nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de D-lactate dans le milieu. La réaction a été réalisée dans un volume de 100µl. 10µl de culture centrifugée ont été pipetés dans 90µl d'une solution contenant un tampon tricine (tricine KOH à 0,1M et pH 8), du NAD⁺ à 3mM, du triton à 0,5%, du MTT à 1mM, et du PES à 0,2mM, le tout supplémenté d'eau stérile. Le signal est stabilisé après un délai de 5 mn. Puis, l'enzyme D-lactate déshydrogénase a été ajoutée, à la concentration de 0,1 unité/ml. L'absorbance est suivie en temps réel pendant trente minutes. A partir de la courbe, la vitesse initiale de formation de formazan a été calculée, elle est proportionnelle à la quantité d'acide D-lactique dans le milieu.

1.5. Dosages enzymatiques des produits de la fermentation

La voie hétérofermentaire est utilisée par *O. oeni* pour la dégradation des carbohydrates. En plus du D-lactate, la dégradation d'une molécule de sucre s'accompagne de la formation d'éthanol, d'acide acétique, et de CO₂. Dans les milieux qui contiennent de l'acide L-malique, il se forme aussi de l'acide L-lactique. Les kits enzymatiques utilisés (R-biopharm) ont été utilisés pour doser les sucres (glucose, fructose), les acides D et L-lactique, l'acide L-malique, l'acide acétique et l'éthanol.

Pour les acides D et L-lactiques, 10µl de culture ont été mis en présence de tampon glycylglycine (100µl), de NAD⁺ (20µl), de glutamate-pyruvate-transaminase ou GPT (20µl), et de D-Lactate déshydrogénase (D-LDH) ou de L-LDH pendant une demi-heure. Les D-LDH et L-LDH oxydent les acides D et L-lactiques en pyruvate, en réduisant le NAD⁺ en NADH. Pour déplacer la réaction, l'enzyme GPT dégrade le pyruvate formé.

Le dosage de l'acide L-malique fonctionne sur le même principe, mais les enzymes sont la malate déshydrogénase et l'enzyme GOT (pour la réaction de déplacement)

Pour les sucres, le dosage du fructose et du glucose ont été réalisés, en une même expérience. 10µl de culture ont été mélangés à 100µl de tampon (NADP⁺, triethanolamine), et 20µl d'un cocktail de deux enzymes : l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Le glucose et le fructose sont phosphorylés en glucose-6-phosphate (G6P) et fructose-6-phosphate (F6P) par l'hexokinase, puis la G6PDH métabolise le G6P en D-gluconate-6-phosphate, consommant une molécule de NADP⁺ pour une de NADPH formé. L'accumulation de NADPH est mesurée par spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 340nm. Dans un premier temps, le glucose est dosé, puis l'ajout de l'enzyme phosphoglucose isomérase métabolise le F6P en G6P, permettant le dosage du fructose.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1.Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN à partir d'une culture bactérienne a été réalisée à l'aide du kit Promega. Il permet d'obtenir rapidement de l'ADN chromosomique de bactérie qui sera utilisé ultérieurement pour les différentes techniques de biologie moléculaire. L'extraction a consisté à prélever une culture bactérienne, la centrifuger à 10000g pendant 5 mn pour isoler les cellules. Le culot a ensuite été incubé pendant une heure à 37°C dans 600µl d'un tampon EDTA 50mM pH8 contenant 10mg/ml de lysozyme. Puis, après centrifugation et élimination du surnageant, 600µl de Nuclei Lysis Solution ont été ajoutés, pour détruire les parois cellulaires et nucléiques, et libérer l'ADN dans la solution. Le tube a été ensuite incubé 5 mn à 80°C pour faire agir le tampon de lyse. Ensuite, 200µl de Protein Precipitation Solution ont été ajoutés, afin de précipiter les composés autres que l'ADN. Ces composés ont ensuite été éliminés par centrifugation pendant 2 mn, et le surnageant récupéré. Il a été transféré dans 600µl d'isopropanol, pour précipiter l'ADN génomique. La solution a été mélangée doucement, puis centrifugée. Un lavage du culot a été effectué à l'aide d'éthanol à 70%.

Après centrifugation, élimination du surnageant, et séchage du culot, l'ADN a finalement été repris dans 50µl d'eau ppi supplémenté de solution de RNase

Le dosage des acides nucléiques a été effectué par mesure d'absorption au spectrophotomètre. L'ADN et l'ARN absorbent à une longueur d'onde de 260nm. L'absorbance est directement corrélée à la concentration en ADN, l'estimation se faisant en multipliant la valeur d'absorbance par 40 pour les ADNs, et par 50 pour les ARNs pour obtenir les concentrations en acides nucléiques. Afin de vérifier la pureté des acides nucléiques, des mesures d'absorbances supplémentaires à 280nm et 320nm ont été effectuées pour estimer la quantité de protéines résiduelles. Le rapport entre l'absorbance à 260nm et 280nm a été calculé, qui doit être compris entre 1.8 et 2 pour certifier de la pureté de l'échantillon.

2.2.Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

- **Extraction d'ARN**

Les extractions d'ARN ont été réalisées dans la glace pendant tout le temps de l'expérience, afin d'inactiver de façon permanente les RNase, très actives. De même, la totalité de la manipulation a été réalisée avec des gants en latex, toujours afin d'éviter au maximum le contact des outils et solutions aux RNases. Les cônes, les tubes Eppendorf et l'eau ont également été stérilisés par autoclavage, l'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate), pour éliminer les protéines. Toutes ces précautions permettent la conservation des ARNs, très fragiles, et d'avoir un meilleur rendement d'extraction.

10ml de culture en phase stationnaire ont été utilisés par extraction. Ce volume a été centrifugé 15mn à 4°C 5300rpm. Le culot a ensuite été repris dans 1 ml de Tri Reagent (Sigma), et le volume a été transféré dans un tube adapté au FastPrep avec des billes de verre (0,2ml de billes de 0,1mm de diamètre), afin de lyser les cellules et libérer les ARNs. La lyse

a eu lieu au FastPrep (MPbio), avec trois cycles de 45s, à une vitesse de 6.5 M/s, entrecoupés de 5 mn de refroidissement dans la glace. Puis, après 15mn de centrifugation, 4°C à 14 000 rpm, 500µl de surnageant ont été transférés dans 500µl de chloroforme, pour solubiliser les membranes, et transférer les protéines dans la partie chloroforme. Après agitation au vortex pendant 10s, une autre centrifugation de 15mn à 14 000rpm, à 4°C est effectuée, et la phase supérieure aqueuse a été transférée dans un volume d'isopropanol, afin de précipiter les ARNs. La précipitation a été faite sur une nuit entière. Puis, une centrifugation à 15mn, 4°C à 14 000 rpm a permis de récupérer un culot qui, lavé deux fois à l'éthanol 75% (dilué à l'eau DEPC). Finalement le culot est séché est repris dans 20µl d'eau DEPC.

La visualisation de la qualité des ARNs, et de l'efficacité de rendement est faite sur un gel d'agarose, à 1,5%, avec du BET. Les produits d'extractions sont dénaturés avant d'être déposés sur gel. Pour cela, 2µl d'ARN sont mélangés à 10µl de formamide et 4µl de formaldéhyde, le mélange est incubé 10mn à 65°C, puis dans de la glace pendant une minute. Le mélange formé tient lieu de mix de charge. Les ARNs sont ensuite mis à migrer dans une cuve d'électrophorèse, pendant une heure à 50mV. Puis les ARNs sur gel sont révélés par exposition aux UV.

La qualité des ARNs, ou leur dégradation est également mesurée en calculant un RIN (RNA integrity number), à partir d'un profil électrophorétique, sur un bioanalyseur. Le profil est comparé à des standards et un numéro de RIN est associé, allant de 1 pour des ARNs fortement dégradés, à 10 pour des ARNs intacts.

- Traitement à la DNase

Afin de pouvoir faire des reverse transcriptions, il est nécessaire d'éliminer l'ADN résiduel qui a été extrait en même temps que l'ARN. Pour cela, le kit turbo DNA free a été utilisé (Ambion). Les produits d'extractions ont été traités à la DNase. La totalité du produit

d'extraction (environ 17µl) a été traitée en une fois. Ce volume a été ajouté à 2µl de tampon DNase, et de deux unités de rDNase (1µl). Le mélange a été incubé après vortex à 37°C pendant une demi-heure. 2µl de DNase inactivation reagent, préalablement homogénéisé a été alors ajouté, et après une incubation de 2 mn à température ambiante et une centrifugation, 1 mn à 14 000g, le surnageant a été récupéré dans un tube eppendorf. Pour vérifier l'absence d'ADN dans le produit, une PCR a été réalisée, en amplifiant le gène pgm, avec un témoin négatif, sans ARN, et un témoin positif, un ADN génomique. Les produits PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1%.

- Préparation d'ADNc

Des réverses transcriptions ont été réalisées sur les produits d'extraction d'ARN traités à la DNase. Pour cela 1µg d'ARN ont été traités par mélange réactionnel (dosés au spectrophotomètre). Le kit iScript cDNA Synthesize Kit (BioRad) a été utilisé. Dans un volume final de 20µl, l'ARN a été mélangé à un mix réactionnel (4µl), et l'enzyme reverse transcriptase (1µl). Le protocole réactionnel est une incubation de 5mn à 25°C, puis 30mn à 42°C, et enfin 5mn à 85°C. Les produits de RT ont ensuite été stockés à -20°C.

2.3.Méthodes d'amplification par PCR

- PCR

La PCR, ou polymerase chain reaction, est une technique mise au point en 1983 par Kary Mullis (Mullis et al., 1986). Elle est très utilisée dans ce travail pour isoler des fragments d'ADN. Elle consiste à amplifier une séquence spécifique d'ADN, encadrée par deux séquences d'amorces d'environ 20bp, suivant plusieurs cycles. En premier lieu, une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C est effectuée afin d'obtenir des fragments simple brins. Ensuite une étape d'hybridation est effectuée, en baissant la température entre 45 et 60°C, pour permettre l'hybridation des amorces sur la matrice. Enfin une étape d'élongation,

généralement à 72°C permet à l'enzyme Taq polymérase de synthétiser l'ADN au niveau de l'accrochage des amorces. La PCR, suivant plusieurs cycles de température, à l'aide d'une Taq polymérase, amplifie le fragment sélectionné. Au départ, l'ADN génomique est utilisé comme matrice, mais au fur et à mesure des cycles de température, l'ADN produit lors des cycles précédents sert lui aussi de matrice. La présence de produits d'amplification est contrôlée par dépôt des produits PCR sur un gel d'électrophorèse d'agarose. Les appareils de marque Biorad ont été utilisés durant la thèse.

- PCR quantitative en temps réel

La technique de PCR quantitative est basée sur le même principe que la PCR classique, mais la quantité d'ADN formé à chaque cycle est directement suivie et mesurée. Dans ce travail, l'ADN formé a été suivi grâce au kit IQ SYBR green Supermix (BioRad). Le mix de PCR contient des molécules de Syber green qui se fixe sur les acides nucléiques et émet une fois fixé une fluorescence verte. A chaque cycle de PCR, les fragments synthétisés sont immédiatement marqués, et l'appareil mesure la fluorescence totale de la réaction qui est ensuite corrélée à la quantité d'ADN formé. La courbe donne l'évolution de la fluorescence au cours du temps. Le Ct est calculé : il s'agit du seuil de cycle pour lequel la courbe de fluorescence se démarque du bruit de fond. C'est le Ct qui sert à comparer les échantillons et résultats. Cette technique a été utilisée dans deux objectifs. L'un permet mesurer l'expression relative de gènes, en mesurant la quantité d'ADNc. Pour cela, l'expression d'un gène de contrôle dont l'expression ne varie pas en fonction des différentes conditions sert de contrôle. L'autre est la quantification de produit PCR formé. Une gamme étalon est construite, en faisant trois dilutions successives au 1/10ème d'une solution du même produit PCR de concentration connue et en mesurant chaque dilution en PCR quantitative.

- MLST

La technique MLST, pour Multi Locus Sequence Typing, consiste à séquencer des gènes ou des portions de gènes, et de comparer les séquences pour la différenciation génétique des souches. C'est une méthode très employée pour étudier les populations bactériennes (Maiden, 2006). Les régions à comparer ont d'abord été isolées par amplification par PCR. Les conditions utilisées étaient les suivantes : 95°C pendant 5mn, puis 30 répétitions d'un cycle : 95°C pendant 30s, 55°C pendant 30s, 72°C pendant 30s. Le kit enzymatique utilisé est le DyNAzyme™ I DNA Polymérase (Finnzymes). Pour un volume réactionnel final de 50µl, 25µl de mix DNAzyme (contenant des DNTPs, la Taq polymérase, et du tampon), 0,05µl de chaque amorce (à 100pM), 1µl d'ADN (à 10ng/µl) ont été pipetés. Certaines régions ont été difficiles à amplifier, et dans ces cas-là, la température d'hybridation a été abaissée jusqu'à 45°C. Pour l'amplification du gène *purK*, certaines séquences très longues ont nécessité un temps d'élongation plus important, de l'ordre de la minute.

2.4. Analyse d'ADN par électrophorèse sur gel

- Visualisation des séquences nucléiques sur gel

Pour la visualisation des acides nucléiques après extraction, amplification par PCR ou des digestions enzymatiques, l'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée. Les gels sont préparés en dissolvant à chaud dans du tampon TAE (Tris Acétate, EDTA, 0,04M Tris, 0,02M acétate, 0,001M EDTA), de l'agarose à des concentrations variant entre 0,5% p/v et 3% p/v en fonction des produits nucléiques à séparer. Du bromure d'éthidium (BET) intercalant les ADNs double brins est ajouté à 0,2µg/µl, pour révéler les gels en fluorescence sous lumière ultra violette. Puis le gel en surfusion est polymérisé dans une cuve d'électrophorèse. Les ADNs sont déposés dans les puits du gel à l'aide d'un tampon de charge (glycérol 50%, TE 50%, bleu de bromophénol 0,25%) et migrent pendant environ une demi-heure à 90mV. Le courant provoque la migration des acides nucléiques, chargés

négativement, vers le pôle positif de la cuve. Les fragments d'acides nucléiques formés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. Après migration, les acides nucléiques ont été révélés par exposition à une lumière ultraviolette (Système d'imagerie Infinity-Capt, Fischer Scientific, Bioblock). La taille des fragments d'acide nucléiques peut être estimée grâce à un marqueur de poids moléculaire, généralement capable de déterminer des tailles entre 100pb et 1500pb (Promega).

- **Electrophorèse en champ pulsé**

L'électrophorèse en champ pulsé est une méthode permettant de séparer des grands fragments d'ADN, supérieurs à 50 kb. Elle permet notamment de séparer des fragments d'ADN génomique bactériens ayant été digérés par une enzyme de restriction. Cette technique a été utilisée pour différencier les souches de la collection de souches.

100 ml de gel d'agarose 1% sont préparés avec du TAE, en utilisant un agarose spécial, qualité champ pulsé (BioRad). L'insert, après rinçage dans du TE est introduit dans un puits du gel et scellé avec de l'agarose en surfusion. La migration a lieu dans une cuve CHEF DR III (Clamped Homogeneous Electric Fields BioRad). La migration s'est déroulée pendant 22 heures, à un voltage de 6V, un angle de réorientation de 120°C, un temps de pulse de 1 à 25s, à la température de 15°C. Lors de cette migration, le marqueur de poids moléculaire utilisé est le MidRange II PFG (New England Biolabs). Il est formé à partir de la digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction XbaI. Le gel a été coloré pendant 20mn en l'immergeant dans un bain de 100ml de TAE contenant 6 μ l de BET, puis révélé par exposition aux ultraviolets. La taille des bandes est mesurée, et les différents profils comparés grâce au logiciel Bionumerics.

2.5. Hybridation ADN/ADN sur membrane

- Fabrication des sondes

La technique d'hybridation sur membrane consiste à déposer des ADNs sur une membrane en cellulose, qui est incubée en condition d'hybridation avec une sonde. La sonde est un gène ou un fragment d'ADN marqué dont on recherche la présence sur un génome ou une séquence d'ADN. C'est une technique moins coûteuse et plus rapide que la PCR.

Les sondes ont été préparées à partir des produits PCR des marqueurs voulus. La taille des sondes est globalement équivalente à un produit PCR classique (environ 500pb). Les produits PCR sont purifiés en ajoutant deux volumes d'éthanol absolu froid et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2, pour un volume de produit PCR. Ensuite, ils sont précipités et centrifugés pendant 15mn à 10 000g. Après rétention du surnageant et un lavage à l'éthanol froid 70%, les culots ont été repris dans 50µl d'eau ppi.

Les fragments de PCR ont ensuite été marqués à la digoxygénine. Ce marquage a été effectué selon le principe du marquage au hasard, par hybridation aléatoire d'oligonucléotides marqués à la digoxygénine, sur l'ADN dénaturé. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est faite par l'enzyme de Klenow qui utilise la terminaison 3'OH des oligonucléotides comme amorce, et intègre des déoxyribonucléotides contenant des DIG-11-dUTP. Les DIG sont incorporés tous les 20-25 nucléotides environ dans le brin d'ADN synthétisé.

Pour chaque sonde, une quantité de 1µg de produit PCR a été employé, et dilué avec de l'eau milliQ jusqu'à atteindre un volume final de 15µl. L'ADN a ensuite été dénaturé par chauffage 10mn à 95°C, puis plongé immédiatement dans de la glace pour éviter la renaturation. Ensuite 2µl d'hexanucléotides, 2µl de dNTP, et 1µl d'enzyme de Klenow ont été ajoutés. Après agitation au vortex et centrifugation, le mélange réactionnel est incubé 24h à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par addition de 2µl d'EDTA 0.2M pH8.

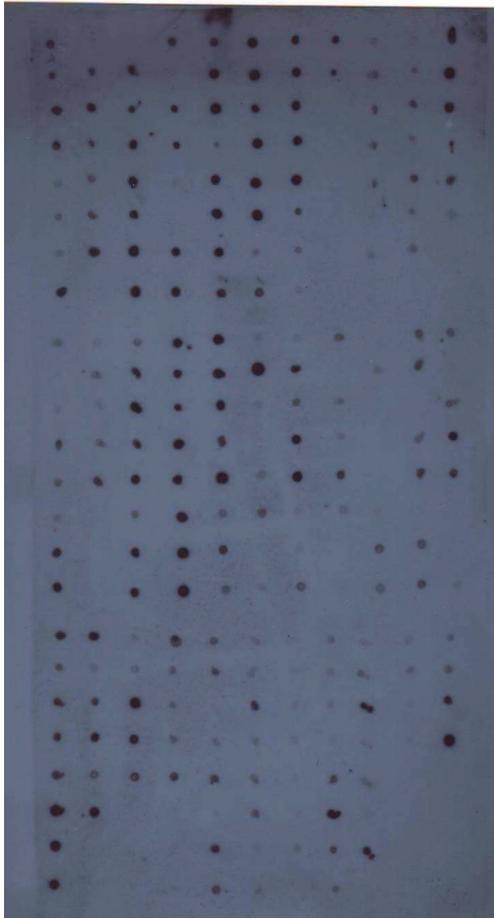


Figure 5 : Membrane en cellulose de l'hybridation du marqueur « glycerol uptake facilitator protein » chez les ADNs génomiques de 282 souches d'*O. oeni*. Chaque ADN a été spotté sur la membrane. Les points noirs correspondent à une hybridation de la sonde du marqueur sur l'ADN génomique.

- Hybridation des sondes

La présence de marqueurs spécifiques dans la collection de 282 souches a été réalisée par cette méthode. Pour cela les ADNs extraits de chaque souche de la collection ont été déposés sur une membrane en cellulose (1µl d'une solution à 10ng/µl). La membrane est traitée à la soude par capillarité pour fixer l'ADN : sur un film de cellophane où 4ml de soude 0,4M sont étalés, la membrane est déposée pendant 10mn. Après lavage au 5 SSC (Saline sodium citrate), les membranes sont placées dans des tubes à hybridation, puis incubées dans du tampon de préhybridation (25ml de 10 SSC, 0,01% de laurylsarcosine, 1% de réactif bloquant, 0,02% SDS) pendant une heure à 60°C. Puis la sonde dénaturée (10mn à 95°C) est ajoutée au même tampon, et la membrane et la sonde sont incubées pendant 16h à 60°C. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois à 60°C dans du 2 SSC, 0,1% SDS, puis deux fois dans du 0,01 SSC, 0,1% SDS, puis dans du tampon de lavage (300ml de tampon maléique, 0,3% de tween20, pendant 1 mn, et enfin dans le tampon de blocage (200ml tampon maléique, 2g réactif bloquant) pendant 30mn. Ensuite, des anticorps anti Digoxygénine ont été dilués au 10 000ème dans du tampon de blocage, puis ajoutés sur la membrane pendant 30mn, afin d'hybrider les anticorps aux sondes. Les anticorps couplés à une phosphatase alcaline, qui en présence d'un substrat chémiluminescent (CDP Star) dégage des photons, sont révélés par autoradiographie. Les spots noircis sont ceux qui ont hybridé avec la sonde (figure 5).

2.6. Restriction génomique par l'analyse REA-PFGE

- Préparation des cellules

La culture bactérienne est centrifugée 5mn à 10 000g. Le culot est lavé deux fois dans du TE, avant d'être repris dans 50µl de T100E (Tris 10mM, EDTA 100mM ph 7,5), puis mélangé avec 50µl de T100E contenant 1% p/v d'agarose à bas point de fusion (BioRad)

dissous. Le mélange ainsi formé est coulé dans des moules prévus à cet effet. L'agarose solidifie pendant 15mn à 4°C, puis les inserts ainsi formés sont démoulés.

- Préparation de l'ADN

Les bactéries emprisonnées dans le gel sont lysées afin de libérer l'ADN. Pour cela les inserts sont incubés dans 1 ml de T100E contenant 10mg de lysozyme (Roche) pendant 2h, à 37°C, puis dans 1 ml de T100E avec 2mg/ml de pronase (Roche) et 1,5% p/v de N-laurylsarcosine (Sigma) pendant 16h à 37°C. Les inserts sont ensuite lavés quatre fois dans 1,5ml de TE pendant 30mn.

- Digestion enzymatique de l'ADN

Après lavage dans de l'eau milliQ, les inserts sont incubés dans 120µl de mélange de restriction, contenant l'enzyme Not1 (30 unités par réaction), dont le site de coupure à 6 nucléotides est peu fréquent sur le chromosome. L'incubation a eu lieu pendant 16h à 25°C. Le nombre de fragments est suffisamment faible pour être analysé sur un gel, mais suffisant pour donner des profils polymorphes. La longueur des fragments nécessite de l'électrophorèse en champ pulsé. Les conditions utilisées sont celles préconisées par le fournisseur (New England Biolabs).

2.7.Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN, principalement de produits PCRs a été effectué à la plateforme de séquençage (au centre de génomique fonctionnel de bordeaux) à l'aide d'un séquenceur 3130 XL Genetic analyser (Applied Biosystem). Selon la méthode de Sanger, les produits PCR ont été purifiés à l'acétate de sodium, puis les réactions de séquençage

effectuées. Dans l'étude MLST, la séquence a été recherchée dans le sens 5'→3', mais également dans le sens 3'→5' pour un séquençage optimal et éviter les erreurs de lecture.

2.8. Confection et analyse de la puce transcriptomique

- **Choix des gènes pour la confection de la « puce » d'expression**

Le choix des séquences à fixer sur le réseau a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire Bordelais de Recherches en Informatique (LABRI). Il comprend :

- Les gènes du génome de la souche PSU1, séquencée en 2005 (Mills et al. 2005), et accessible sur les banques de données.
- Des gènes issus de la comparaison *in silico* des génomes PSU1/ATCC BAA 1163, SB1491/IOEB8413, et SB396/IOEB8413.
- Des gènes issus de l'hybridation soustractive entre 5 souches du laboratoire
- Des gènes dont les séquences déposées dans Genbank concernaient des fonctions métaboliques ou des protéines de stress issus de divers travaux sur *O. oeni* ou d'autres bactéries lactiques.

- **Calcul de l'expression des gènes sur la puce**

Pour chaque gène, et pour chaque souche, trois valeurs principales ont été calculées pour donner le résultat précis du niveau d'expression.

- La valeur d'expression relative des gènes. Elle est obtenue en calculant la différence des unités de fluorescence entre l'expression en milieu témoin et l'expression en milieu de stress. Une valeur de 1 correspond à une variation d'expression d'un facteur 2
- Les valeurs d'intensité de fluorescence ont également été mesurées , en unités arbitraires, selon un base logarithmique en base 10.

- Une p-value a été calculée : elle permet de vérifier de façon statistique le différentiel d'expression. Seuls les résultats ayant des p-values inférieures à 0.01 ont été considérés comme des variations d'expression.

3. Analyses bioinformatique

3.1. Analyses de génétique des populations

- Harmonisation des populations

Les analyses de génétique de populations nécessitent d'avoir des populations de taille égale, quel que soit l'estimateur à calculer. Malheureusement, en biologie, ce critère est souvent difficile à satisfaire. Pour pallier ce problème, des logiciels créent artificiellement des populations plus petites, par calcul analytique à partir de l'échantillon des populations de départ. Nous avons utilisé le logiciel Rarefaction (disponible sur <http://www.uga.edu/strata>).

- Diversité et richesse allélique

La richesse allélique est un indice précis et efficace pour estimer la diversité allélique de populations. Il est obtenu en calculant le nombre moyen d'allèles par locus, pour l'ensemble des souches d'une population. La diversité allélique (H_s), aussi appelée la diversité génique de Nei (Nei et Chesser, 1983), est un indice un peu plus complexe, qui estime également le degré de diversité d'une population. Il est basé sur la formule $H_s = [n / (n-1)] * (1 - \sum p_i^2)$, n étant la taille de la population étudiée, et p_i la fréquence de chaque allèle dans la population. Le H_s est calculé pour chaque locus, puis une moyenne est effectuée pour obtenir la diversité allélique de la population. Cet indice varie entre 0 et 1 : 0 pour une diversité nulle, et 1 pour une diversité maximale. Les deux indices de diversité ont été calculés à l'aide du logiciel GENETIX (Belkhir et al., 1996).

- **Diversité et richesse génotypique**

La mesure de diversité génotypique est un autre estimateur de la diversité d'une population. Pour l'étude par MLST, le génotype est la combinaison d'allèles de l'ensemble des loci analysés. La richesse génotypique est le nombre moyen de génotypes par population, pour des populations de taille égale.

Ensuite, l'indice de Simpson est calculé. Il est l'équivalent de l'indice de diversité allélique, pour l'étude de génotypes. La formule est identique, mais le pi représente cette fois-ci le pourcentage de chaque génotype dans la population étudiée. Il est sensible à la proportion de génotypes fréquents dans la population. Cet indice a été calculé grâce au logiciel GENCLONE (Arnaud-Haond et Belkhir, 2007).

- **Pourcentage G+C**

Le pourcentage G+C (ou %G+C) est souvent utilisé en taxonomie bactérienne, correspond au pourcentage des bases guanine et cytosine dans une séquence d'ADN et diffère selon les espèces. Dans un chromosome, il peut varier grandement dans certaines régions. Cela permet de repérer des transferts de gènes horizontaux, des séquences de gènes importés lorsque leur % G+C est différent de celui du reste du chromosome. Il est calculé à l'aide du logiciel MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

- **Diversité nucléotidique**

La diversité nucléotidique est un concept moléculaire utilisé pour évaluer le degré de polymorphisme au sein d'une population (Nei et Li, 1979). Elle correspond au nombre moyen de différences nucléotidiques par site entre paires de séquences prises au hasard dans la même espèce. Cet indice est également couramment utilisé pour la comparaison de séquences et estimer la diversité, et le degré de polymorphisme pour un locus, dans une population. Il a été calculé grâce au logiciel DnaSP (Librado et Rozas, 2009).

- Rapport Dn/Ds

Le rapport Dn/Ds informe sur la pression de sélection exercée sur un gène. Il consiste à calculer pour un gène le rapport du nombre moyen de mutations non synonymes par site (Dn) au nombre moyen de mutations synonymes par site (Ds). Si la pression de sélection est grande sur une séquence, le nombre de mutations silencieuses (ou synonymes) est beaucoup plus important que le nombre de mutations non synonymes. Le rapport est alors très inférieur à 1. À l'inverse pour un gène évoluant vite, un rapport supérieur à 1 dénote un nombre plus important de mutations non synonymes. Cet indice a été calculé à l'aide du logiciel DnaSP (Librado et al., 2009).

- Recombinaison génétique

La recombinaison génétique est un mécanisme important chez les bactéries. C'est un des facteurs essentiels du maintien et de l'accroissement de la diversité génétique dans une population. Il fait apparaître de nouveaux allèles. Il aboutit à un échange de matériel génétique entre deux génomes différents, ou bien entre deux séquences homologues. La recombinaison intervient aussi bien entre souches d'une même espèce qu'entre différentes espèces.

La recombinaison intragénique : elle se produit à l'intérieur d'un locus, et provoque l'apparition de nouveaux allèles. L'importance de la recombinaison intragénique dans l'apparition de nouveaux allèles est mise en évidence par le logiciel Splitstree (Huson et Bryant, 2006), qui construit des arbres en split décomposition. A partir des séquences des allèles d'un locus, un processus évolutif d'apparition des allèles est proposé. Si l'apparition de mutations est linéaire, faite de mutations successives dans une séquence, alors la recombinaison intragénique est inexistante. Au contraire, une structure en réseau ne peut expliquer la création des nouveaux allèles par les mutations successives. Dans ce cas, la recombinaison joue un rôle important dans l'apparition de ces allèles.

La recombinaison intergénique : Elle porte sur des grands fragments de séquences, et correspond à des grands réarrangements chromosomiques. La recombinaison a lieu, non à l'intérieur des loci, mais dans des séquences non codantes, ou des séquences répétées. La recombinaison intergénique est mesurée en analysant l'association des allèles de différents loci. S'il n'y a pas de recombinaison, les allèles sont fortement associés entre. Le déséquilibre de liaison entre les allèles est estimé par le calcul de l'indice d'association standard (F_A^S), grâce au logiciel START 2 (Jolley et al., 2001). Il est calculé à partir du nombre total de loci (l), de la variance du nombre de loci différents (Vd) et de celle attendue à l'état d'équilibre (Ve). La formule est $F_A^S = 1/(l-1)(Vd/Ve-1)$. Cet indice est égal à 0 s'il y a équilibre de liaison, donc une population panmictique. Un indice d'association des allèles différent de 0 indique un déséquilibre de liaison et une tendance clonale.

3.2. Analyses de structures de populations

- **Arbre phylogénétique**

La phylogénie est un concept très utilisé, qui permet de classer et comparer les individus ou des espèces en fonction de leur évolution génétique. Elle permet d'estimer l'évolution des organismes vivants et d'observer des liens de parenté entre eux. La phylogénie d'une espèce se fait en comparant et analysant la similarité de séquences, nucléotidiques ou protéiques. En fonction du nombre de mutations, du modèle évolutif, ou simplement de la ressemblance des séquences, un arbre phylogénétique est créé. Plusieurs méthodes existent. La méthode de parcimonie construit l'arbre qui minimise le nombre de mutations, délétions, ou insertions ponctuelles pour passer d'une séquence à l'autre. Cette méthode recherche le réseau le plus économique en substitutions. La méthode de vraisemblance, plus probabiliste se base sur la recherche d'un arbre en fonction d'un modèle évolutif donné. La méthode de distance, ou UPGMA, consiste à calculer la distance génétique entre des séquences deux à deux. Une matrice de distance est créée avec l'ensemble des séquences étudiées. A partir de cette

matrice, un arbre phylogénétique est construit. La méthode Neighbor Joining (ou méthode dite du plus proche voisin) est une variante de la méthode de distance, et prend en compte la divergence moyenne de chaque séquence avec toutes les autres, et non plus deux par deux, et autorise un taux de mutations variable pour les différentes branches. Les arbres obtenus sont corrigés grâce à un modèle donné. Dans l'étude par MLST, le modèle choisi a été la correction de Kimura 2 (Kimura, 1980), qui suppose une fréquence plus importante pour les transitions que les transversions. Les arbres phylogénétiques ont été construits grâce au logiciel MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

- **Dendrogramme**

Lorsque les données ne sont pas des séquences nucléiques ou protéiques, la création d'arbres phylogénétiques n'est pas la méthode adaptée pour le classement d'individus. Notamment pour des données binaires (présence/absence), ou des comparaisons de profils électrophorétiques, il n'est pas possible d'utiliser ces algorithmes. On construit alors un dendrogramme, correspondant à un diagramme généralement utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes générés par un regroupement hiérarchique. C'est de cette façon que les profils en champ pulsé ont été comparés, de même qu'ont été étudiées la présence/absence de marqueurs chez les souches de la collection, ou des caractères phénotypiques, comme la dégradation ou non de sucres, ou alors la survie en conditions de stress. Les analyses et le clustering sont basés sur une comparaison deux à deux des profils, et créent une matrice de distance. Les algorithmes utilisés changent en fonction du type de données traité. Dans le cas des présences de marqueurs, ou des données REA-PFGE (des données binaires), le coefficient de Dice a été utilisé. Dans le cas des données de phénoypes, c'est la distance euclidienne qui a été employée. Elles ont été réalisées à l'aide du logiciel Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgique).

- **Minimum spanning tree**

Les résultats ont été également analysés par la construction d'un minimum spanning tree. Cet arbre compare les variations alléliques dans la séquence concaténée des souches, en calculant le nombre de mutations de différence deux à deux. Il se base sur le nombre minimum de mutations nécessaires pour le lignage de souches, à partir d'une souche fondatrice. On en déduit le niveau de la séparation des souches, et leur appartenance à des complexes clonaux, groupes de souches très proches phylogénétiquement. Dans cette étude, les complexes clonaux ont été calculés en comparant les séquences concaténées des 7 gènes séquencés pour l'analyse MLST. Un ensemble de souches appartenant à un même complexe clonal diffère de trois mutations au maximum à partir de la plus proche séquence. Le minimum spanning tree a été calculé grâce au logiciel Bionumerics.

- **Bootstrap**

Le bootstrap est une technique de rééchantillonnage destinée à mesurer une estimation d'une statistique, sa dispersion, ou des tests d'hypothèse. Ce test contrairement à d'autres, ne nécessite pas d'information supplémentaire que celle disponible pour l'échantillon. Cette technique, a été adaptée en phylogénie par Bradley Efron en 1979 (Efron, 1979), et permet de connaître la solidité des branches d'un arbre phylogénétique. Des rééchantillonnages aléatoires à partir de l'échantillon de départ sont effectués (à partir de 100 jusqu'à plusieurs milliers d'itérations). Pour chaque rééchantillonnage, un arbre phylogénétique est construit, et la fréquence à laquelle un embranchement est retrouvé constitue alors la valeur de bootstrap pour cet embranchement. Des bootstraps à partir de 70 dénotent de branches robustes.

3.3. Analyses statistiques

- **Analyse de la variance à un facteur**

L'analyse de la variance (ou ANOVA) est un test statistique visant à comparer les égalités de moyennes entre différentes distributions. Les distributions doivent être normales et de variance identique. Le test de l'ANOVA est une généralisation du test t de Student, à plus de deux groupes. Il permet la comparaison de nombreux groupes ou distributions, en tenant compte de l'ensemble des données. Typiquement, ce test sert à comparer les résultats de distribution d'un caractère entre une condition témoin et une condition testée, afin de savoir si cette condition a un effet. Ce test permet uniquement de savoir si des groupes de distribution ont des moyennes égales ou non. Il ne permet en aucun cas de savoir quels groupes diffèrent des autres. Pour cela des tests supplémentaires existent, appelés tests post hoc. L'analyse de la variance à un et deux facteurs a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica.

- **MANOVA**

L'analyse de la variance multivariée est une généralisation du test de l'ANOVA, utilisée lorsque plus d'une variable est analysée. Les variables peuvent être dépendantes ou indépendantes. Ce test permet d'une part de comparer différentes populations ou groupes d'individus en fonction de plus d'une variable, et d'autre part d'observer la relation de dépendance entre les différentes variables. De plus des tests statistiques annexes basés sur de l'analyse en composantes principales permettent de discriminer les populations. Ce test a été effectué grâce au logiciel Bionumerics.

- **Tests post hoc**

Les tests post hoc sont une extension au test de l'ANOVA. L'ANOVA permet de savoir si plusieurs distributions ont des moyennes statistiquement égales ou non. Si ce n'est pas le cas, les tests post hoc sont utilisés pour savoir quelle(s) distribution(s) sont statistiquement

différentes des autres. Plusieurs tests existent, basés sur des algorithmes différents, et utilisés dans des cas bien particuliers. Trois tests ont été particulièrement utilisés (test de Tukey, test de Bonferroni, test de Neuman-keuls), réalisés à l'aide du logiciel Statistica :

Le test de Tukey, ou intervalle HSD (Honestly Significant Difference), compare toutes les paires de moyennes et montre des différences avec un risque alpha. La technique du HSD permet de spécifier un "*family confidence level*". C'est un test plutôt conservatif, dans le sens qu'il est plus sévère que d'autres tests dans la différenciation de deux groupes.

Le test de Bonferroni ne tient pas compte de la taille des groupes. Il génère des intervalles qui permettent de faire un nombre défini de comparaisons linéaires parmi les moyennes d'un échantillon, tout en contrôlant le taux d'erreur expérimental à un niveau défini.

Le test de Neuman Keuls est une procédure de comparaisons multiple pour comparer toutes les paires de moyennes en contrôlant le risque alpha global, à un niveau défini. Bien qu'il ne fournisse pas d'estimation de l'intervalle de différence entre chaque paire de moyennes, ce test indique quelles moyennes sont significativement différentes des autres. Ce test élimine une partie des calculs effectués par les autres tests et est donc beaucoup plus rapide à calculer. Il est cependant moins précis que les autres.

- Tests non paramétriques

Parfois, lorsque le jeu de données à étudier ne suit pas de loi normale, il n'est pas possible d'utiliser les analyses de variance classique. Pour les remplacer, des tests non paramétriques sont disponibles. Ces tests s'utilisent quand aucun autre test paramétrique n'est adapté, en cas de trop faible échantillonnage, des variances non égales, ou une distribution non normale. Ces tests sont moins puissants que les tests paramétriques, mais beaucoup plus flexibles. Durant cette étude, seul le test de Kruskal Wallis a été utilisé. Ce test est semblable

au test de l'ANOVA mais il prend en compte tous types de distribution. Ce test a été calculé grâce au logiciel Statistica.

RESULTATS

PARTIE 1 :
DIVERSITE GENETIQUE DE L'ESPECE *OENOCOCCUS OENI*

1. Diversité génétique de l'espèce *Oenococcus oeni*

Les études sur la diversité de l'espèce *Oenococcus oeni* ont été nombreuses depuis quelques années, et ont la plupart du temps fait appel aux analyses en champ pulsé, ou bien à la RAPD. Mais, toutes ces études souffraient d'un échantillonnage trop faible, et le plus souvent peu représentatif de l'espèce bactérienne. Chaque étude utilisant des souches, de populations différentes, il n'est pas possible de rassembler les résultats et se faire une idée précise de la diversité globale d'*O. oeni*. Pour pallier à ces problèmes, une collection importante de l'ordre de 510 souches a été créée, provenant de nombreuses origines géographiques, cépages, et de matrices différentes (cf. index). Une étude poussée de la diversité génétique a été entreprise, par trois méthodes différentes. Premièrement, une approche REA-PFGE a été entreprise. Parallèlement à cela, une étude MLST d'*O. oeni* a été réalisée, pour voir l'évolution et la structure de l'espèce. Enfin, la présence de marqueurs génétiques potentiellement associés à des performances œnologiques a été recherchée, afin de tenter de corréler un déterminisme génétique à des caractéristiques phénotypiques.

1.1. Analyse de la collection par typage des souches en REA-PFGE

La collection décrite dans la partie « Matériel et méthodes » (paragraphe 1.1), rassemblant 510 souches, a été analysée par REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis - Pulsed Field Gel Electrophoresis) en utilisant l'enzyme de restriction *Not I*. Cette enzyme possède des sites de coupure rares et donne un nombre réduit de fragments. Cette technique, utilisée en premier lieu, est reconnue depuis longtemps pour la qualité de ses résultats, chez *O. oeni*. Au total, 363 profils uniques de REA-PFGE ont été obtenus. Parallèlement à ce polymorphisme important, plusieurs clones ont pu être identifiés, correspondant à un même individu prélevé plusieurs fois par un même laboratoire, et stocké dans la collection sous des noms différents. Chacun des 363 profils correspondaient à une combinaison de 1 à 14

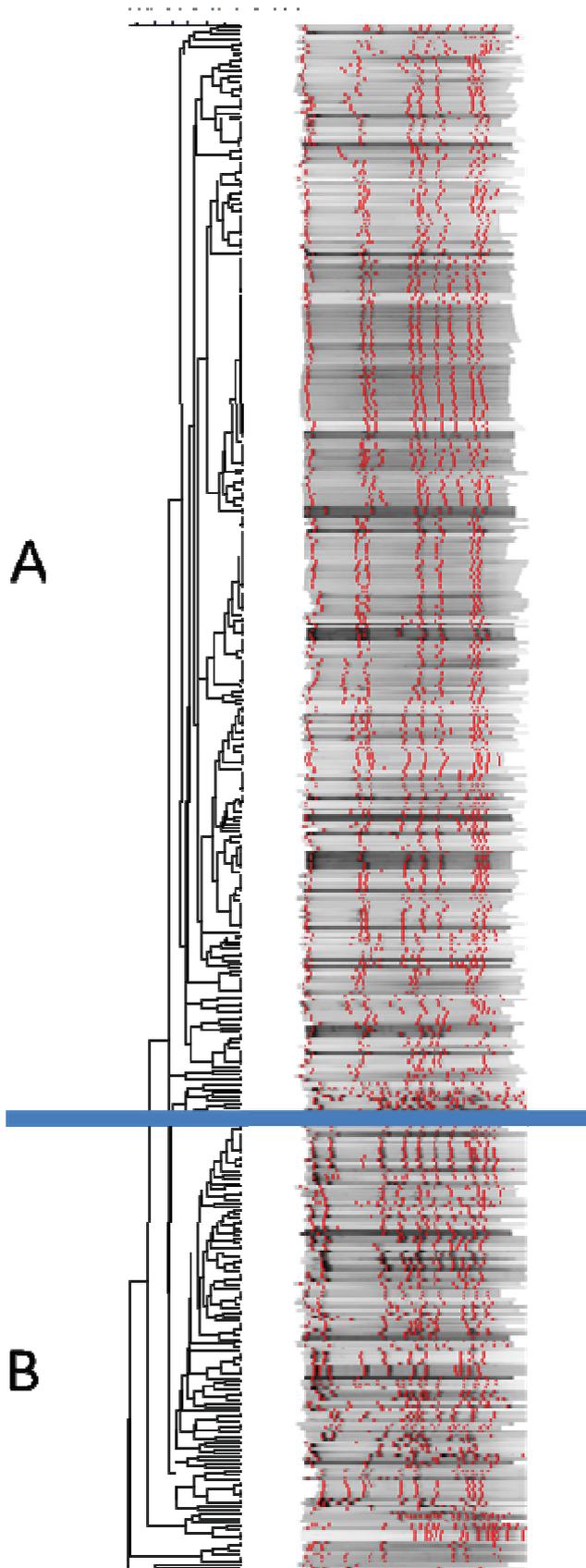


Figure 6: Dendrogramme des profils PFGE des 520 souches de la collection. L'arbre a été séparé en deux branches, correspondant aux souches des groupes phylogénétiques A et B

fragments. Au total, 29 fragments de restriction de différentes tailles, de 12 à 438 Kb, ont été mis en évidence dans toute la collection.

Un dendrogramme a été réalisé pour discriminer les souches et observer des groupes et des associations génétiques (figure 6). Il a été réalisé par la méthode UPGMA à partir des profils NotI-PFGE. La première observation est que la population se divise en deux grands groupes, nommés A et B. Cette partition de l'espèce en deux groupes phylogénétiques distincts a déjà été observée dans la littérature, avec d'autres méthodes (De Las Rivas et al., 2004; Bilhere et al., 2009; Larisika et al., 2008; Zavaleta et al., 1997). De façon intéressante, les souches commerciales se retrouvent dans la partie haute du dendrogramme (groupe A). D'un autre côté, les souches de cidre sont majoritairement retrouvées dans le groupe inférieur (groupe B).

1.2. Relation entre le profil PFGE et l'origine des souches

Une analyse MANOVA a été réalisée sur les 510 profils REA-PFGE, en comparant la répartition de ces profils chez 16 populations d'origine géographique différentes. Les souches isolées en Grèce se différencient significativement des autres, avec une distance importante par rapport à l'origine (figure 7A). Aucune autre population n'a pu être différenciée des autres par l'origine géographique. Même pour les souches de Grèce, des profils statistiquement différents pourraient s'expliquer par un biais dû à une présélection où seules les souches les plus divergentes auraient été retenues. Ceci montre que la phylogénie observée grâce à l'analyse des profils de restriction en champ pulsé ne peut pas être clairement associée à une origine géographique précise. Toutefois, certaines souches isolées en France et en Espagne sont groupées loin des autres, mais elles avaient toutes été isolées à partir de cidre.

L'analyse MANOVA a été ainsi renouvelée, mais en s'intéressant cette fois-ci au type de produit dont les souches ont été isolées, sans tenir compte de l'origine géographique des souches. Cette analyse a donné une meilleure délimitation des groupes créés. Mais comme

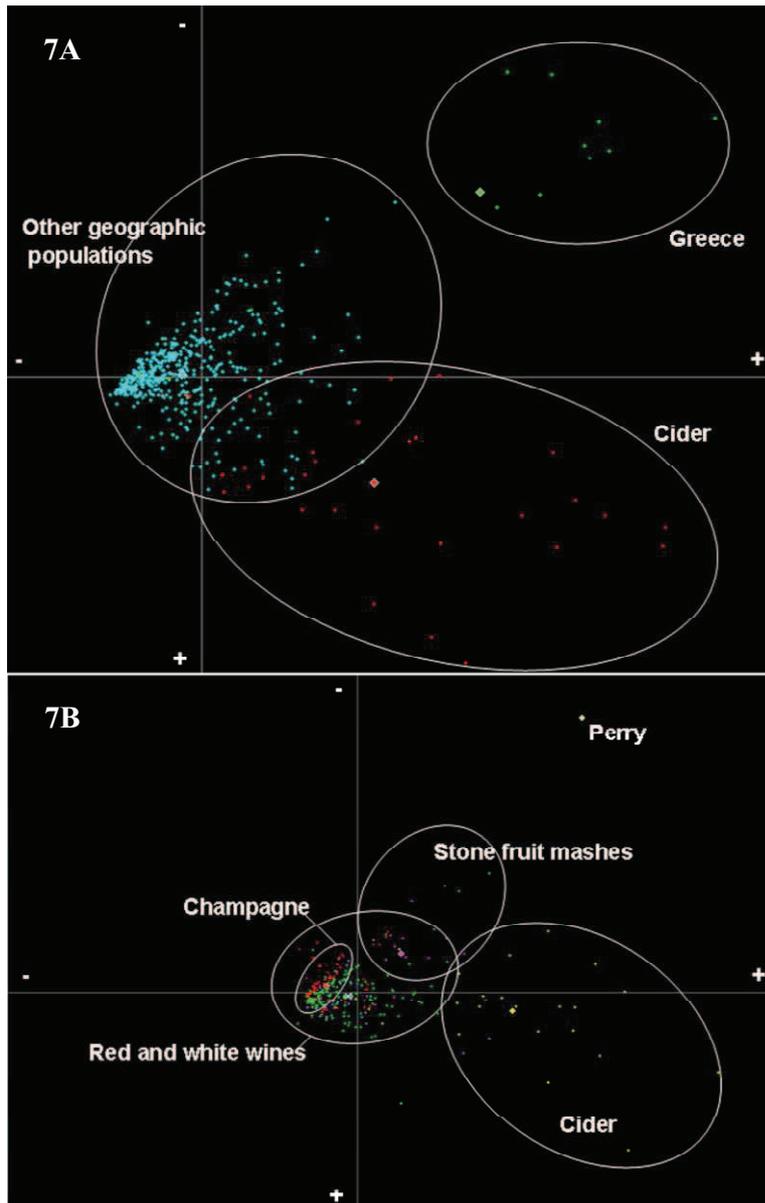


Figure 7: Analyse MANOVA des profils REA-PFGE des 513 souches ayant des données géographiques (7A), et 314 souches ayant des données correspondant au type de produit (7B). chaque point représente un profil individuel, les losanges représentent les moyennes.
 7A: points verts; souches de Grèce; points rouges: souches de Normandie; points bleus: toutes les autres souches
 7B: points jaunes souches de cidre; points rouge: champagne; points bleus: vin blanc; points violets: fruits à noyaux; points blancs: poiré

dans la collection initiale, l'origine n'a pas été précisée pour toutes les souches, seules 314 souches sur 518 ont servi à l'analyse. Elles représentent 6 populations issues de matrices différentes (vin rouge, vin blanc, cidre, champagne, fruits à noyaux, et poiré). La figure 7B fait apparaître des groupes, avec la moyenne pour la population de cidre se retrouve loin de l'origine. De même, pour la population de souches issues de fruits à noyaux, et pour l'unique souche issue de poiré. Ceci indique une discrimination importante et significative de ces trois groupes, par rapport aux souches isolées de vins blancs, de vins rouges et de vins de champagne. Les souches de vin rouge et blanc ne sont absolument pas différenciées, proches du centre du graphe. Mais les souches de vins de champagne, bien que dans la même zone que les souches de vins blancs et rouges, sont concentrées dans une petite partie du graphe. Il en ressort donc une discrimination plus nette de la population de champagne, dont la diversité est moindre que pour les autres.

1.3. Typage de la collection par MLST

A partir des résultats REA-PFGE, 282 souches ont été retenues pour une analyse MLST. D'abord, les souches choisies ont toutes des profils de restriction différents. Cependant, exceptionnellement, des souches présentant des profils identiques ont été incluses parce qu'elles avaient des origines géographiques différentes. Les souches ont été également sélectionnées pour couvrir au maximum la diversité géographique disponible, celle des produits (vin rouge, vin blanc, champagne, cidre, fruits à noyaux, différents cépages), et des années d'isolement (de 1981 à 2008).

1.3.1. Sélection des gènes cibles

Dans l'étude MLST, 7 gènes dits de « ménage » ont été séquencés chez les 282 souches. Les gènes cibles ont été choisis sur la base de la précédente étude MLST effectuée par Eric Bilhère durant sa thèse (Bilhère et al., 2009) : ce sont les gènes *gyrB*, *g6pd*, *pgm*, *dnaE*, *purK*,

Gène	Fonction des gènes	Taille d'amplicon (pb)	Amorces	Séquence 5'-3'
<i>gyrB</i>	gyrase, β subunit	674	gyrB-1 gyrB-2	CTTCGGTTGTTAATGCTTTGTC CAACTTGGTTTTTGTCTGCC
<i>g6pd</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase	669	g6pd-1 g6pd-2	TTATATGTCTGTTGCTCCTCGT CCGGTTCTGATGTAAAAAGG
<i>pgm</i>	phosphoglucomutase	654	pgm-1 pgm-2	ATATCTGCCGAAGTGCTAAGAG AGCAGCAATTTGATTTCCAG
<i>dnaE</i>	DNA polymerase III, α subunit	714	dnaE-1 dnaE-2	CGTATATAGAGCGCTTTGCC CGTTCTTATCGCGAGTTGTAC
<i>purK</i>	phosphorybosylaminoimidazole carboxylase	597	purK-1 purK-2	TGGTTATCATGTTGGTATTTGG GAAGCAGGAGCATAGGAAAGA
<i>rpoB</i>	RNA polymerase, β subunit	665	rpoB-1 rpoB-2	CGATATTCTCCTTTCTCCAATG CTTTAGCGATCTGTTCCAATG
<i>recP</i>	transketolase	676	recP-1 recP-2	AGCGACAAACCATCCTTTATC CGACAGCTAAGGAATCATGAG

Tableau 2 : Liste des gènes utilisés pour la MLST

Locus	Taille du fragment (bp)	Nb d'allèles	pourcentage G+C	Nb de sites polymorphiques ^b	Diversité nucléotidique ^c	dn/ds ^d
<i>gyrB</i>	611	19	40,7	88 (11)	0,006	0,077
<i>g6pd</i>	551	18	41,2	95 (19)	0,008	0,275
<i>pgm</i>	531	15	41,4	14 (6)	0,002	0,431
<i>dnaE</i>	665	19	38,9	30 (11)	0,009	0,243
<i>purK</i>	537 (1397) ^a	27	42,2	122 (37)	0,010	0,196
<i>rpoB</i>	598	10	43,4	103 (14)	0,036	0,062
<i>recP</i>	592	37	45,8	148 (43)	0,029	0,148

Tableau 3 : Diversité allélique et nucléotidique des gènes de MLST

a : longueur du locus *purK* avec le transposon

b : nombre de sites informatifs est indiqué entre parenthèses

c : représentée par le nombre de substitutions nucléotidiques par site, en analyse par paire

d : ratio entre le nombre de mutations non synonymes sur le nombre de mutations synonymes

rpoB, *recP* (tableau 2). Ils sont répartis équitablement, tout autour du chromosome. Cela permet d'éviter le biais possible de certaines régions plus sensibles aux mutations, ou arrivées par transfert horizontal. Ils ont également été retenus pour leur grande variabilité de séquence afin de générer suffisamment de différence. Le huitième gène utilisé dans la précédente étude, *ddl* n'a pas été retenu du fait de la trop grande conservation de sa séquence.

Pour chaque souche, à partir des séquences des 7 gènes, une séquence concaténée de 4085 pb a été construite. Parmi les 282 souches analysées, les 7 loci n'ont pu être séquencés que pour les 262, en raison de la trop grande difficulté d'amplification de certains. Au total, 20 séquences n'ont pas pu être amplifiées chez 20 souches, en dépit de l'utilisation de conditions de PCR plus souples, et de la recherche de couples d'amorces différents. Cela concerne trois gènes. Pour 19 souches isolées de vin, il s'agit des loci *purK* et *recP*. Pour *purK*, la raison est l'insertion d'un transposon d'une taille de 860 pb, ce qui rend le séquençage de certains allèles difficile. Pour le gène *recP*, l'amplification restait impossible, même après diminution de la température d'hybridation. Quant au gène *dnaE*, il n'a pas pu être amplifié chez une souche de cidre. Les 20 souches concernées ont donc été retirées de l'analyse.

Quasiment toutes les mutations observées dans les allèles sont des substitutions. Seulement un évènement de délétion d'une base a été observé pour un allèle du gène *recP*, et l'évènement d'insertion précédemment cité dans le gène *purK*. Dans ces deux cas, les mutations provoquent un décalage du cadre de lecture et donc une inactivation de la fonction du gène.

1.3.2. Diversité allélique de la collection

La collection présente une diversité allélique moyenne de 20,7 allèles par locus (tableau 3), allant de 10 allèles séquencés pour *rpoB*, jusqu'à 37 allèles pour le gène *recP*. En revanche, le nombre d'allèles rares est élevé. En éliminant ces allèles rares (présents au

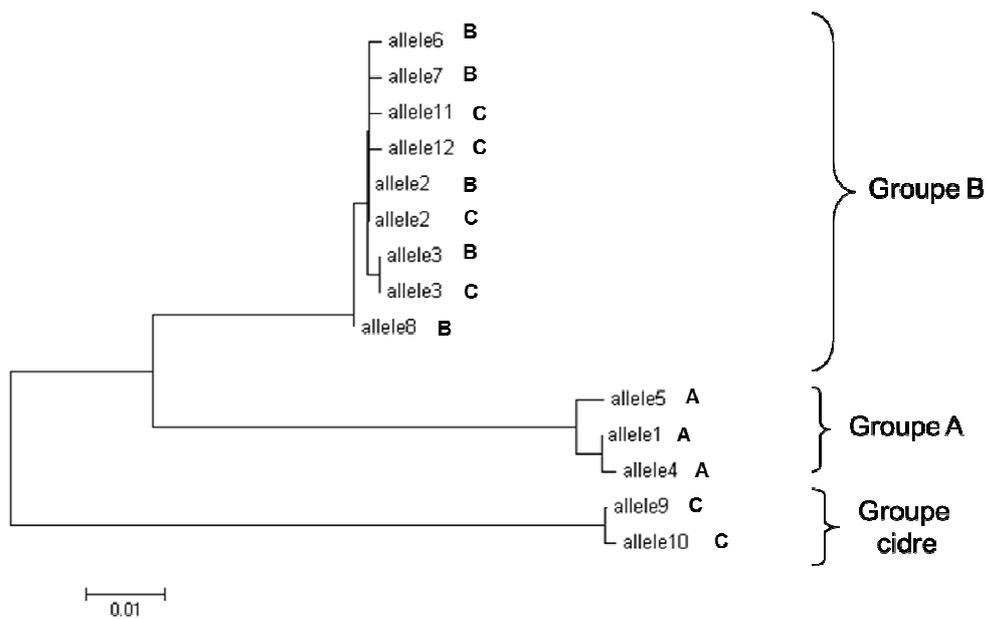


Figure 8: Arbre phylogénétique en neighbor joining des séquences des allèles du locus *rpoB*. Le numéro de chaque allèle a été associé à la phylogénie des souches dans lesquelles ce locus a été retrouvé.

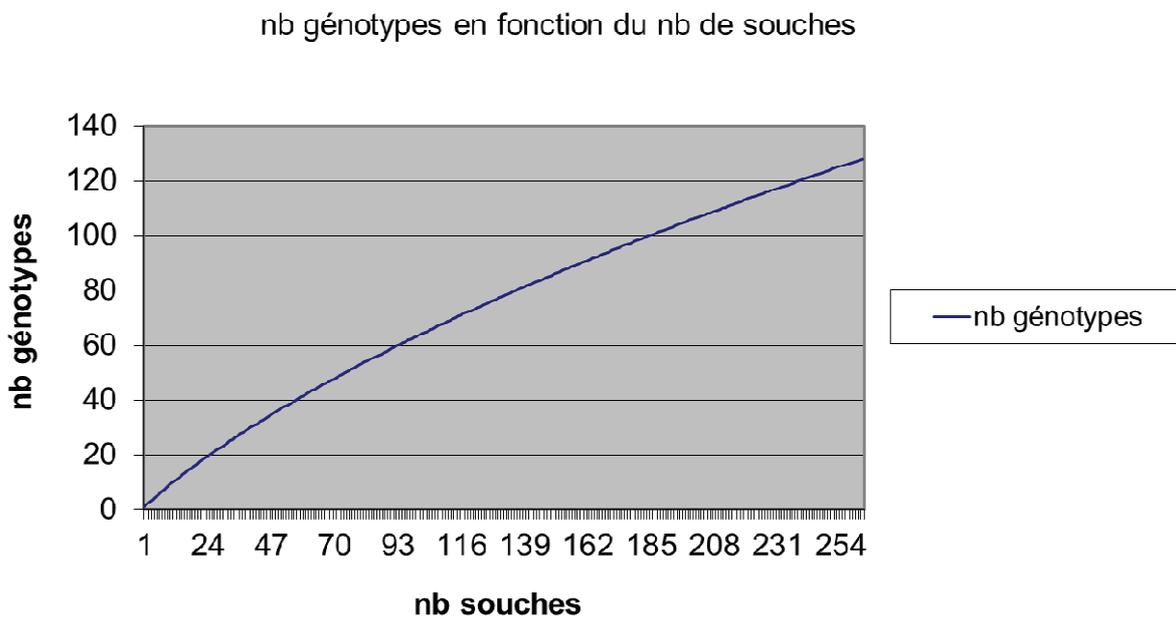


Figure 9: Nombre de génotypes moyen par population, en fonction de la taille d'échantillonnage de la population

maximum chez 2 souches de la collection), la diversité allélique chute de moitié, pour atteindre 10,2 allèles par locus. La diversité nucléotidique varie entre 0,002 pour *pgm* jusqu'à 0,036 pour *rpoB*. Cinq loci présentent une diversité vraiment faible, inférieure à 0,01 (*gyrB*, *g6pd*, *pgm*, *dnaE*, *purK*). Seuls les gènes *rpoB* et *recP* présentent une diversité nucléotidique plus importante, avec des valeurs respectives de 0,036 et 0,029. Ces valeurs restent faibles, comparées à la diversité nucléotidique observée chez d'autres espèces bactériennes comme *E. coli* (Wirth et al., 2006), qui a été mesurée entre 0,015 (*purA*) et 0,038 (*fumC*). La diversité nucléotidique élevée de *rpoB* s'explique par le fait que ce locus présente deux allèles avec des séquences très divergentes, malgré un faible nombre d'allèles. En outre, on retrouve un nombre de sites polymorphiques par gène variable, allant de 14 pour *pgm*, jusqu'à 148 pour *recP*. Parmi les loci étudiés, seul *recP* apparaît hypervariable par rapport aux autres gènes. Ces résultats montrent la forte conservation génétique de l'espèce, à l'échelle du génome entier.

Un arbre phylogénétique a été réalisé pour chaque gène. Excepté pour *pgm* et *recP*, tous présentent la même configuration. Les allèles sont divisés en trois groupes : des allèles sont présents uniquement chez des souches du groupe A, des allèles pour les souches du groupe B, et des allèles pour les souches de cidre (figure 8). Pour *pgm*, ces trois groupes n'apparaissent pas à cause de la faible diversité génétique de ce locus. A l'inverse pour le locus *recP*, qui est le plus variable, deux groupes sont observés, mais pas séparés en groupes phylogénétiques A et B.

1.3.3. Rapport dn/ds

La proportion de mutations synonymes par rapport au nombre de mutations non synonymes a été calculée. Ce rapport, appelé aussi dn/ds permet de connaître l'évolution de la pression de sélection d'une espèce. Il est faible dans la séquence concaténée (0,204), et ne dépasse pas 0,431 lorsque les gènes sont analysés séparément. Cette surreprésentation de

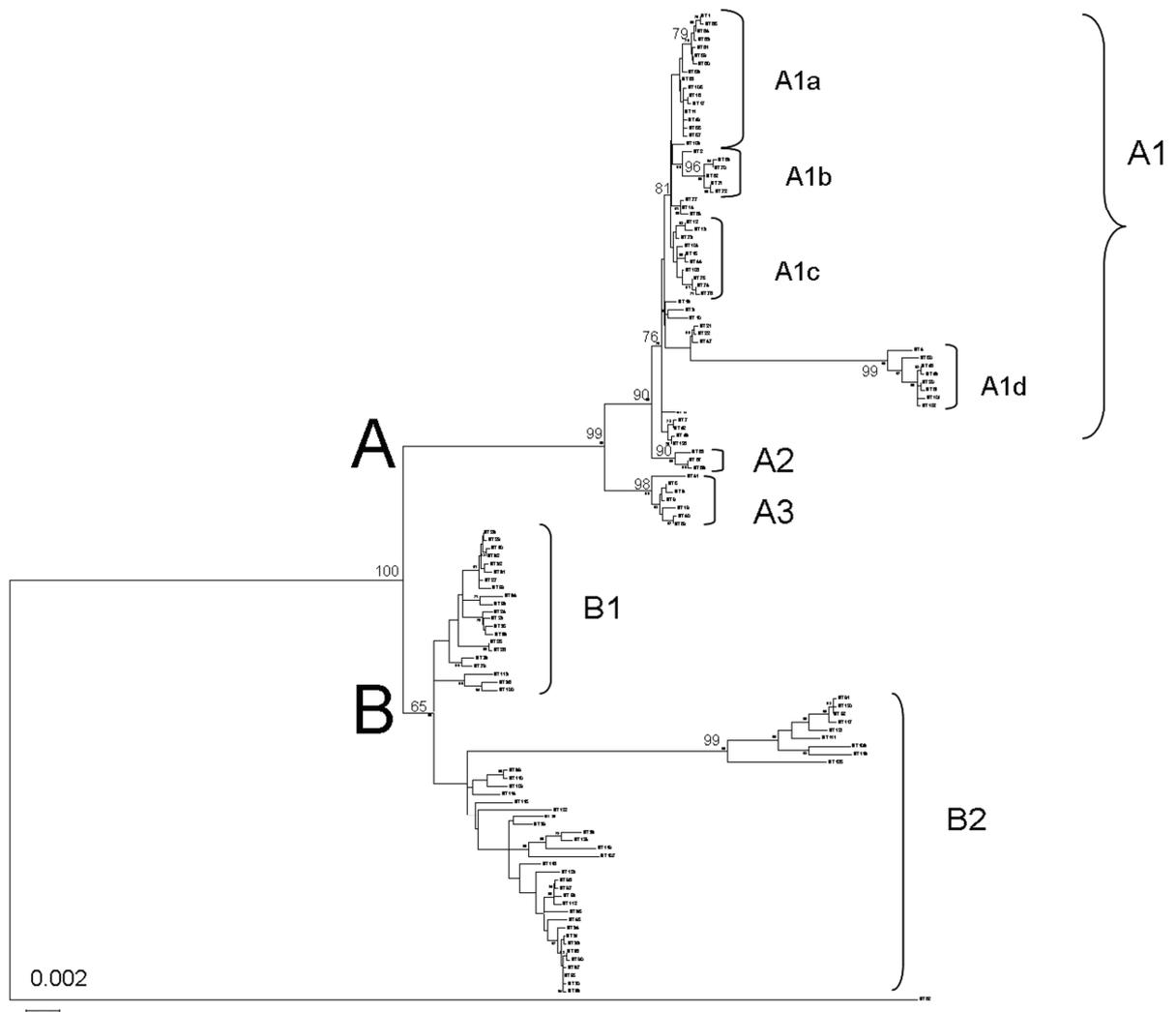


Figure 10: Arbre phylogénétique en Neighbor Joining de la séquence concaténée de MLST. Les groupes et sous-groupes phylogénétiques ont été marqués. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% ont été indiquées

mutations synonymes est la preuve d'une pression de sélection importante chez ces gènes. Ce résultat n'est pas étonnant dans le cas des gènes de ménage qui sont censés être essentiels et ne pas être trop modifiés.

1.3.4. Diversité génomique

La séquence concaténée des 7 gènes donne une séquence d'une longueur de 4085 pb. Au total 127 séquences différentes ont été trouvées (aussi appelée séquence type ou ST) pour les 262 souches. La ST 11 est très représentée dans la collection, avec 39 souches comportant ce génotype. A l'inverse, 87 génotypes rares ont été observés, présents seulement chez une souche. La question de savoir si la diversité observée dans cette collection était représentative de la diversité globale de l'espèce a été posée. En effet, au fur et à mesure de l'analyse, de moins en moins de nouveaux génotypes apparaissent. Pour vérifier si la diversité était représentée, une analyse de raréfaction a été réalisée. Elle consiste à construire la courbe du nombre de génotypes dans la population en fonction du nombre de souches. La figure 9 montre que même si un nombre conséquent de génotypes a été découvert, la courbe est encore loin d'atteindre le plateau, ce qui signifie que cette collection est encore loin de représenter l'espèce bactérienne.

1.3.5. Construction de l'arbre en Neighbor Joining

Un arbre phylogénétique destiné à différencier les 127 ST a été construit, selon la méthode Neighbor Joining (figure 10). Il sépare, avec une valeur de bootstrap de 100, la population en deux groupes phylogénétiques appelés A et B. La comparaison avec les résultats de l'analyse REA-PFGE montre que ce sont les mêmes groupes qui sont délimités. Il faut remarquer que ces deux approches sont basées sur des principes complètement différents. L'approche MLST se focalise sur l'apparition de mutations simples, des SNP, signes de la diversité neutre. L'approche REA-PFGE montre quant à elle des modifications importantes de

génomomes, avec des réarrangements chromosomiques plus ou moins grands, des insertions/délétions de fragments entiers. Ce résultat donne un poids important à l'hypothèse de la séparation de l'espèce en deux sous-espèces distinctes.

L'analyse plus fine de l'arbre, parce qu'il porte sur un grand nombre de souches, a permis de distinguer des sous-groupes à l'intérieur des groupes A et B. 6 sous-groupes se détachent dans le groupe A (A1a, A1b, A1c, A1d, A2, A3), et 2 dans le groupe B (B1 et B2). Le sous-groupe A1a comporte le plus grand nombre de souches (72), qui proviennent de régions variées. Le sous-groupe A1b est particulier, car il contient surtout des souches isolées au Chili, mais aussi des souches d'Afrique du Sud.

Le groupe A1d apparaît génétiquement éloigné des autres à cause de l'insertion dans le locus *purK*. Il comprend des souches de Champagne et de Bourgogne, les seules régions où de telles souches sont isolées. Les seules exceptions sont une souche du Jura (donc proche des régions bourguignonnes et champenoises), et une souche isolée de vin italien, où le transposon existe. La délétion dans le gène *recP* a également été trouvée exclusivement dans les souches de l'est de la France (Bourgogne, Champagne, Jura).

Enfin, les groupes A2 et A3 ne sont séparés qu'en raison de la divergence des allèles de *recP*. De façon intéressante, l'ensemble des souches de cidre, ainsi que les souches isolées de fruits à noyaux, et de poiré sont dans le groupe phylogénétique B, et réparties préférentiellement dans le groupe B2. Le génotype des souches, et leur appartenance aux groupes phylogénétiques a été présentée en index.

1.3.6. Analyse multivariée de la variance et analyse discriminante.

Une MANOVA a été faite pour étudier les mutations dans la séquence concaténée, et tenter d'en associer certaines à des groupes phylogénétiques précis. Des moyennes des variances de chaque groupe phylogénétique ont été comparées et intégrées sur un graphe

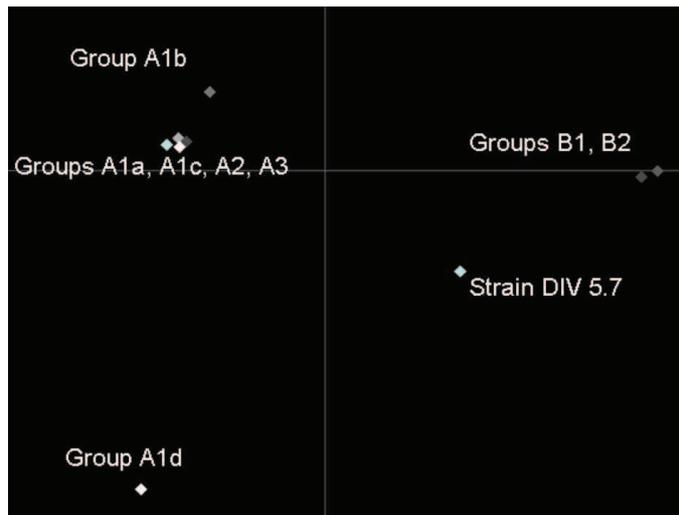


Figure 11 : Analyse MANOVA des mutations de la séquence concaténée des sept gènes discriminant les groupes phylogénétiques. Chaque point représente la valeur moyenne de la variance pour chaque groupe phylogénétique

mutation	contribution à la discrimination	mutation	contribution à la discrimination
purK:424	33,912	recP:314	12,168
purK:132	29,31	recP:304	11,626
GyrB:440	19,207	rpoB:150	11,105
recP:465	19,121	recP:322	11,02
pgm:209	18,856	recP:279	10,957
pgm:467	17,897	recP:289	10,922
purK:481	14,903	GyrB:224	10,281
purK:462	14,255	rpoB:381	10,255
purK:490	14,233	G6PD:445	10,122
recP:313	12,575	dnaE:311	10,091
recP:316	12,575		

Tableau 4 : Liste des mutations les plus discriminantes dans la différenciation des groupes phylogénétiques

(figure 11). Cette analyse a fourni des marqueurs précis et fiables permettant de détecter l'affiliation d'une souche à un groupe phylogénétique donné. La significativité des groupes phylogénétiques a été analysée (A1a, A1b, A1c, A1d, A2, A3, B1, B2, et C)

Au total, plus de 600 mutations ont été recensées sur la séquence concaténée, et donc chacune d'elles ont été analysées séparément. 251 mutations en ressortent, qui discriminent les groupes phylogénétiques, avec des scores de contribution variant de 0,004 à 33,9. Les 21 mutations ayant des valeurs supérieures à 10 ont été mises dans un tableau (tableau 4). Par exemple, la mutation *purK* 424 a séparé les souches du groupe A du groupe B, les mutations *rpoB* 150 et *rpoB* 384 les groupes B et A1b des autres groupes. Les mutations *purK* 462, et *purK* 490 distinguent la souche DIV 5.7, appartenant au groupe C des deux autres groupes. La mutation *purK* 481 discrimine à la fois la souche du groupe C, mais également les souches du groupe A1d. La mutation *pgm* 209 différencie les groupes A1a, A2 et A3 des autres groupes.

1.3.7. Cas particulier de la souche DIV 5.7

La souche DIV 5.7, isolée dans un échantillon de cidre de Normandie, a une séquence concaténée très différente des autres, à tel point qu'elle forme une troisième branche dans l'arbre phylogénétique. Pour cette souche, les séquences des loci *gyrB*, *g6pd*, *purK*, *rpoB*, et *recP* sont très différents des autres, avec parfois des divergences de plus de 100 mutations par rapport aux autres allèles. Dans le calcul global, le nombre de sites mutés dans la séquence concaténée va de 337 pb quand la souche DIV 5.7 n'est pas intégrée dans la collection analysée, jusqu'à 600 pb quand cette souche est intégrée.

Le séquençage de la région 16S a été réalisé et confirme que cette souche appartient bien à l'espèce *O. oeni*. L'absence de séquence intermédiaire entre les allèles de cette souche et des autres souches suggère deux hypothèses. La première est le transfert horizontal d'allèles chez cette souche à partir de bactéries d'une autre espèce, pour l'instant inconnue. La seule homologie de séquence trouvée est celle entre un allèle du gène *rpoB* de DIV 5.7 et un

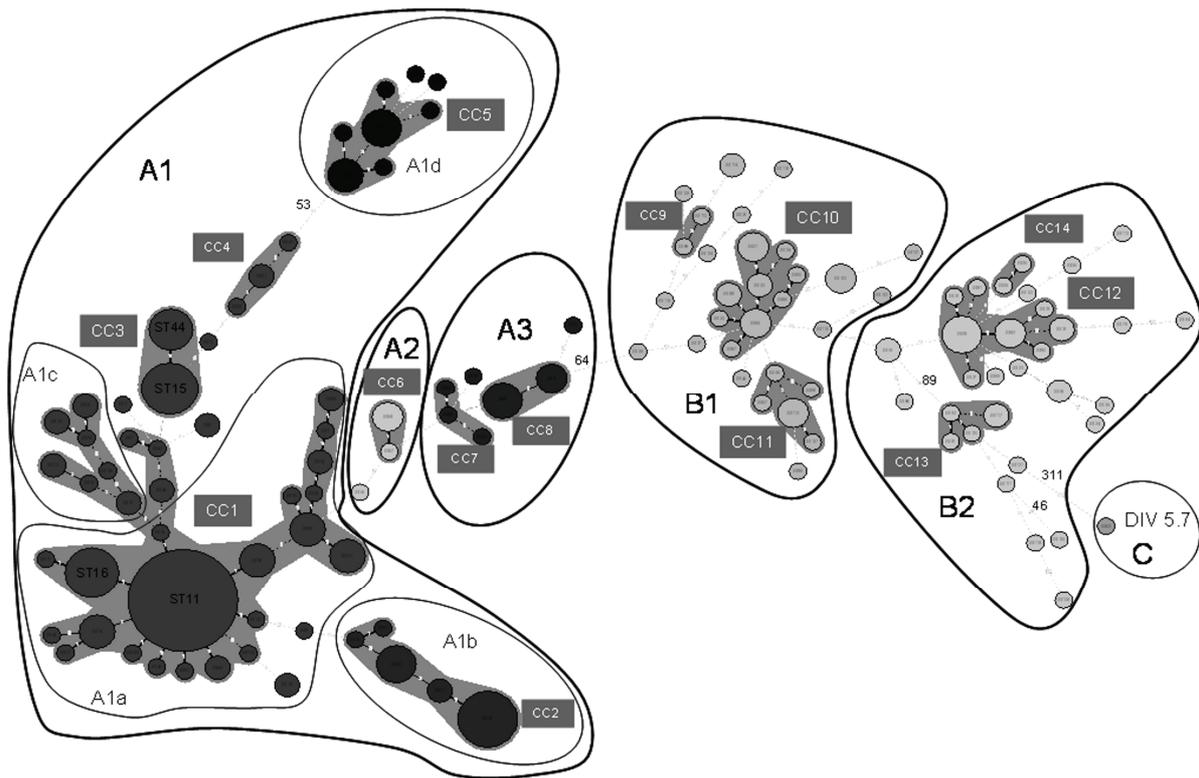


Figure 12: Minimum spanning tree sur les séquences MLST des 258 souches. Chaque cercle représente une ST différente, le diamètre des cercles sont proportionnel au nombre de souches. Les groupes colorés correspondent aux 14 groupes clonaux (CC), chaque ST différant de moins de 4 mutations dans la séquence concaténée étant inclus dans un même CC. Les ST différant de plus de 26 mutations ont été indiquées. Les sous-groupes phylogénétiques ont été annotés.

	Variance observé	Variance attendue	$I_A^S(a)$
Population entière	2,4106	1,1001	0.1985*
Groupe A	2,1761	1,2412	0.1253*
Groupe B	2,213	1,4183	0.0934*
Groupe B sans cidre	1,6294	1,4967	0,0148
Groupe B cidre seul	2,2194	1,2162	0.1375*
Groupe A sans Champagne Bourgogne	2,3275	1,2545	0.1426*
Groupe A sans Chili	2,0711	1,2439	0.1108*

Tableau 5 : Recombinaison intragénique entre populations l'indice d'association des allèles (I_A^S) détermine le déséquilibre de liaison, les valeurs avec un astérisque sont des valeurs qui indiquent un déséquilibre de liaison significatif.

allèle de *Lactobacillus johnsonii*, avec 77% d'homologie. La deuxième hypothèse est l'existence d'un troisième groupe phylogénétique jamais mis en évidence jusqu'ici, et qui pourrait être spécifique au cidre. D'ailleurs, une autre souche présentant des allèles tout aussi divergents a également été séquencée mais non retenue, car l'allèle du gène *dnaE* n'a pas pu être obtenu. Cette souche provient également de cidre, mais n'est clairement pas phylogénétiquement reliée à la souche DIV 5.7.

1.3.8. Construction d'un minimum spanning tree

Un arbre en minimum spanning tree a été construit en utilisant le logiciel Bionumerics (figure 12). Cette approche permet d'observer la structure génétique de la population, et de mettre en évidence des groupes clonaux. En fixant à moins de quatre mutations dans la séquence concaténée, 14 groupes clonaux ont été mis en évidence. Les deux groupes phylogénétiques sont bien visibles. Le groupe A1 comprend trois grands groupes clonaux majeurs, correspondant aux sous-groupes A1b et A1c, et les autres souches du groupe A1. Le groupe clonal le plus important comprend 37 souches présentant la même ST (la ST 11). Peu de souches du groupe A ne sont pas englobées dans un groupe clonal (9 sur 175). Le groupe B est subdivisé en deux groupes clonaux majeurs, correspondant globalement aux sous-groupes B1 et B2, et 4 petits groupes clonaux, ainsi que de nombreuses souches isolées (31 sur 81). Ceci indique que la diversité génétique est plus importante dans ce groupe.

1.3.9. Recombinaison intragénique

Les allèles des 7 loci ont été analysés avec le logiciel splitstree, pour évaluer le rôle de la recombinaison intragénique dans l'apparition de nouveaux allèles (figure 13). L'association des allèles a été retranscrite dans un arbre, sa forme déterminant s'il y a eu recombinaison pour la création d'un ou plusieurs allèles. Une forme en réseau indique une ou plusieurs recombinaisons, alors qu'un arbre linéaire reflète l'absence de recombinaison.

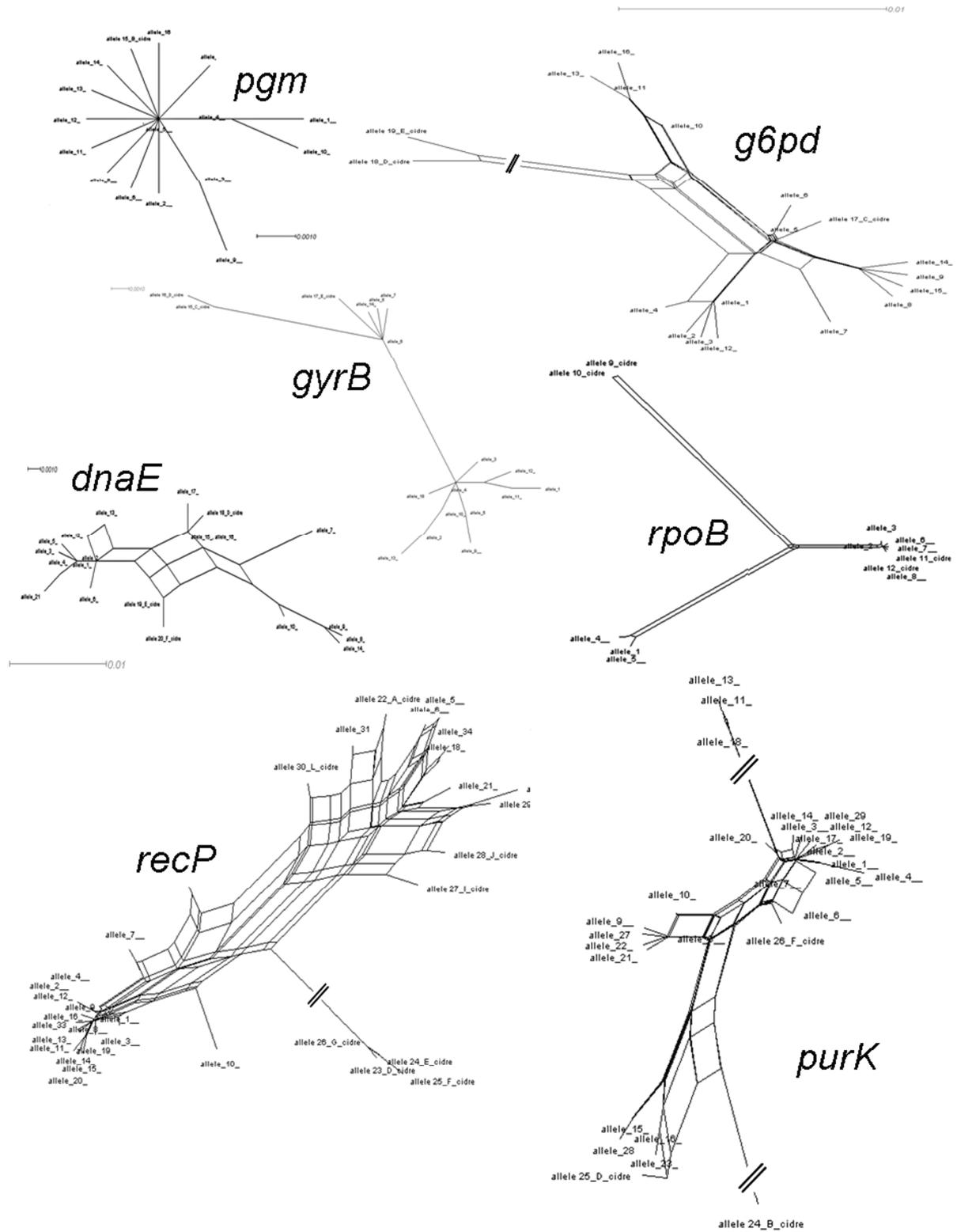


Figure 13: Graphes d'analyse splitstree de chaque locus utilisé en MLST

La conformation linéaire a été trouvée pour trois loci (*gyrB*, *pgm* et *recP*), alors que celle en réseau apparaît pour les 4 autres loci. L'arbre splitstree du gène *g6pd* est composé de deux groupes majeurs représentant les groupes phylogénétique A et B et des allèles du cidre. Le tout forme un réseau important, qui disparaît cependant lorsque les allèles spécifiques aux souches de cidre sont retirés de l'analyse. Cette configuration se retrouve dans l'arbre de *dnaE*. Ceci suggère que pour les souches de vin, l'apparition des allèles ne se fait que de façon linéaire, alors qu'elle résulterait de recombinaisons pour les allèles des souches de cidre.

Finalement seulement deux gènes (*purK*, *recP*) présentent des conformations en réseau, signe d'une recombinaison intragénique importante pour la formation des allèles. Quand les allèles de *purK* des groupes A et B sont analysés séparément, la configuration en réseau disparaît pour les allèles du groupe B. Il est donc clair que la recombinaison explique seulement les nombreux allèles des souches du groupe A. Pour *recP*, la recombinaison est très importante. La majorité des allèles, que ce soit pour les souches du groupe A, B ou de cidre, semblent avoir été créés par recombinaison. Ceci est assez inhabituel, et suggère que ce gène évolue indépendamment des autres gènes.

1.3.10. Recombinaison intergénique

La recombinaison intergénique, mesurée par l'indice standard d'association des allèles (I^S_A), a permis de conclure, pour la collection entière, à une recombinaison intergénique très importante avec un indice de 0,199 ($p < 0,01$), mais avec un certain déséquilibre de liaison, signe que la recombinaison ne se fait pas entre toutes les souches (tableau 5). En effet, les indices d'association pour les souches des groupes A et B diminuent, et passent respectivement à 0,125 ($p < 0,01$) et 0,089 ($p < 0,01$). Ceci montre que même si la recombinaison est importante dans un groupe, il y a probablement peu d'échange de matériel génétique entre eux, et donc finalement peu de recombinaison entre des souches de groupes



Figure 14 : Arbre phylogénétique en neighbor joining des séquences concaténées de 6 gènes MLST (tous sauf recP)

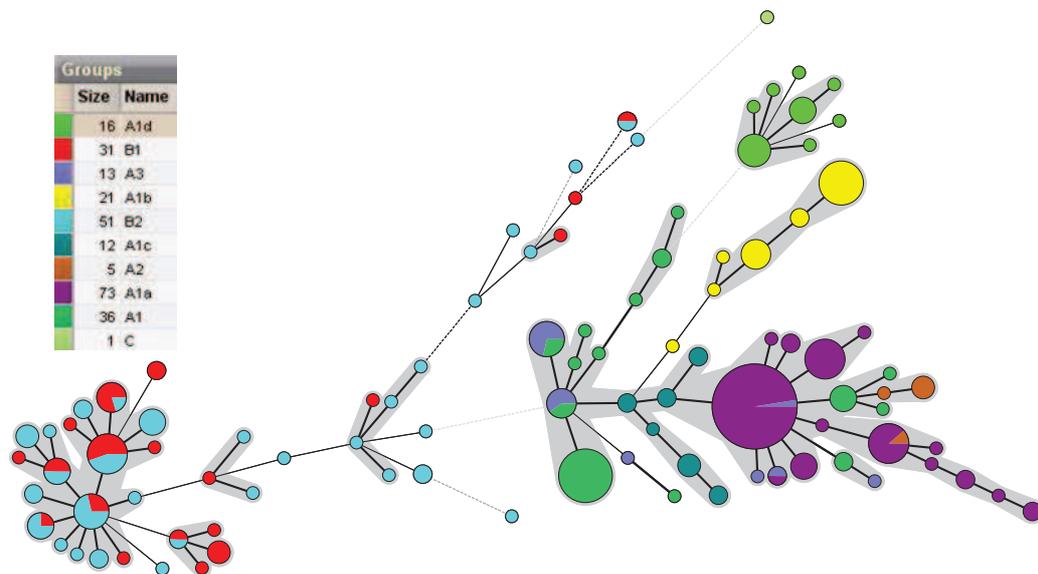


Figure 15: Minimum spanning tree des séquences concaténées de 6 gènes utilisés en MLST (tous sauf recP). Chaque cercle représente une ST différente, le diamètre des cercles est proportionnel au nombre de souches. Les groupes phylogénétiques ont été associés à des couleurs.

phylogénétiques différents. Cependant le déséquilibre de liaison ne peut pas être entièrement expliqué par l'existence des groupes A et B. D'ailleurs, pour le groupe B, il disparaît totalement lorsque les souches de cidre sont retirées de l'analyse.

1.3.11. Analyse MLST sans le locus *recP*

L'étude MLST a montré que le gène *recP* a une modèle évolutif particulier, différent des autres. En effet il recombine beaucoup plus, présente une diversité allélique plus importante. Dans le chromosome bactérien, ce gène est situé juste à côté d'une séquence d'insertion. Ceci pourrait en partie expliquer que ce gène ait été particulièrement difficile à amplifier chez certaines souches l'analyse MLST a été reprise en omettant ce gène. Les séquences concaténées, sans *recP* ont donc été réalignées et représentées dans un autre arbre phylogénétique. Il en ressort un nombre plus faible de ST, de l'ordre de 97.

La conformation de l'arbre est également moins compliquée (figure 14), avec moins de groupes phylogénétiques. Dans le groupe B, les sous-groupes B1 et B2 disparaissent ; il en est de même pour les sous-groupes A2 et A3. En revanche, dans le groupe A1, même si les distances génétiques sont plus faibles, les groupes A1b et A1d restent visibles et se démarquent. La recombinaison importante de *recP*, responsable de l'apparition de nombreux allèles est donc probablement à l'origine de sous-groupes spécifiques.

Le minimum spanning tree montre la même organisation (figure 15). De façon plus marquée, le nombre de groupes clonaux diminue un peu, mais surtout, le nombre de souches non intégrées dans un groupe clonal chute de façon considérable. Seulement cinq souches du groupe A et 16 souches du groupe B ne font pas partie d'un groupe clonal, et la plupart des souches du groupe B sont celles du cidre.

Par ailleurs, dans les analyses de génétique des populations, en excluant *recP*, les résultats ne sont pas modifiés et aboutissent aux mêmes conclusions. Le gène *recP* apporte donc un surplus de diversité, permet de différencier un plus grand nombre de souches, et fait

Populations	Richesse géotypique	Indice de Simpson	Richesse allélique	Diversité allélique (Hs)
Afrique du Sud	14,1	0,98	5,91	0,71
Chili	3	0,57	2,43	0,49
Italie	14,1	0,98	5,99	0,68
Allemagne	13	0,98	4,57	0,61
Bourgogne	8,8	0,88	4,36	0,53
Champagne	10,2	0,91	3,4	0,48
Aquitaine	12,7	0,97	7,06	0,72
Vin rouge	10,9	0,95	6,81	0,76
Vin blanc	9,5	0,91	5,92	0,64
Champagne	9	0,92	3,14	0,52
Cidre	13,9	0,98	5,96	0,64

Tableau 6 : Analyse génétique de diversité des populations groupées selon leur origine géographique et selon le produit dont elles ont été isolées

apparaitre de nouvelles ST. Pour autant, sa participation à l'analyse ne modifie aucunement les résultats. Il a donc été décidé de le garder dans la suite du travail.

1.4. Correspondance entre groupes phylogénétiques et origine géographique des souches

La collection comprend 7 populations géographiques. Des échantillonnages trop faibles peuvent entraîner des biais importants lors des analyses. Nous avons retenu les populations comprenant plus de 15 souches. Les populations ont été comparées, afin de vérifier si elles étaient génétiquement homogènes, ou si des disparités existaient. Ces 7 populations sont les populations isolées dans les régions de Bourgogne (31 souches), Champagne (21 souches) Aquitaine (28 souches), Italie (25 souches), Allemagne (16 souches), Afrique du Sud (23 souches) et Chili (18 souches).

Pour les populations italiennes, allemandes, Sud-Africaines et d'Aquitaine, la richesse allélique est de même ordre, avec en moyenne 6 allèles par locus (tableau 6). Les populations de Champagne et de Bourgogne sont moins diverses, mais c'est la population chilienne qui est la moins diversifiée, avec seulement deux allèles par locus en moyenne. L'analyse de la diversité allélique (H_s) qui varie entre 0 pour une diversité nulle, et 1 pour une diversité maximale, confirme ces résultats. Deux groupes distincts sont formés, avec d'un côté les populations de Bourgogne, Champagne et Chili avec un H_s autour de 0,5, et les autres populations avec un H_s de 0,7.

L'analyse de la richesse génotypique montre globalement le même type de résultats, les populations ont des indices de diversité similaires. En moyenne 10 à 14 ST par population ont été recensés (pas de différence significative), sauf pour la population chilienne (3 ST). Ceci a été confirmé par la comparaison des indices de Simpson (indice de diversité génotypique), aux alentours de 0,98 pour les populations d'Allemagne, Italie, Afrique du sud, Aquitaine,

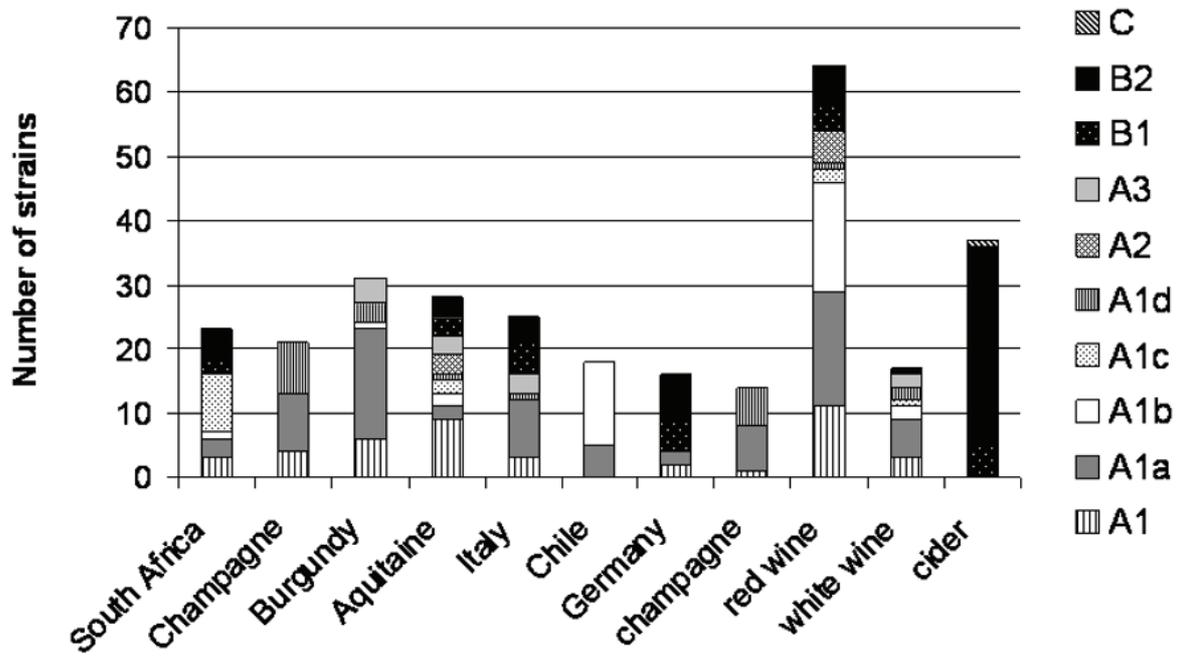


Figure 16 : Répartition des populations en fonction de leur position dans l'arbre phylogénétique. La figure est divisée en deux parties. Les sept premières barres représentent les populations géographiques, les quatre dernières barres correspondent au type de produit

mais plus faible chez les populations de Bourgogne et de Champagne (0,9) et beaucoup plus faible pour la population chilienne (0,57).

La composition des populations et leur position sur l'arbre phylogénétique a été comparée. Les populations sud-africaines, chiliennes, bourguignonnes et champenoises se distinguent (figure 16). La population sud-africaine est composée de souches dispersées dans l'arbre entier, équitablement entre les groupes phylogénétiques A et B. Cependant 9 souches sur 23 de la collection sont dans un groupe phylogénétique A1c, composé en grande partie de souches sud-africaines (9 sur 13), ce qui suggère une évolution particulière de cette population. Ce génotype dominant en Afrique du sud pourrait être le signe de souches adaptées aux conditions d'Afrique du Sud, notamment un climat chaud se rapprochant de celui méditerranéen. La même chose a été observée pour la population chilienne, avec 13 souches sur 18, qui sont classées dans le groupe A1d, où l'on trouve aussi des souches d'Australie, de Bourgogne et d'Aquitaine.

Les populations champenoises et bourguignonnes, avec un échantillonnage plus important que les autres, sont en totalité dans le groupe phylogénétique A, et plus particulièrement dans les groupes A1a et A1d (44 souches sur 50). De plus, les événements d'insertion et délétion observés dans les gènes *purK* et *recP* sont présents exclusivement dans ces populations. Cela dénoterait une spécificité génétique des souches de ces régions, associée à une faible diversité allélique et génétique. L'acidité, qui est un point commun aux vins de Champagne et de Bourgogne pourrait expliquer ce résultat. Ces souches mieux adaptées à ces conditions seraient sélectionnées, expliquant de ce fait la chute de diversité.

1.5. Analyse des populations en fonction du type de produit d'origine

A cause de données manquantes concernant l'origine exacte de certaines souches, 134 souches sur les 262 ont été analysées. Les souches retenues ont été isolées à partir de vin

rouge (64 souches), vin blanc (17 souches) champagne (15 souches) et d'autres produits comme les cidres et les fruits à noyaux (38 souches au total pour l'ensemble de ces deux populations). La population de vin rouge est la plus diverse, avec une richesse allélique de 7 allèles par locus. Pour les souches de vin blanc et de cidre, la richesse allélique est de 6 allèles par locus. La population de champagne est encore une fois moins diverse, avec seulement 3 allèles par locus. Cette tendance est confirmée par le calcul du H_s . Cependant, la diversité génotypique reste identique pour toutes les populations, avec des valeurs d'indice de Simpson variant autour de 0,95. Ceci peut s'expliquer, pour la population champenoise, par une forte recombinaison, qui augmente le nombre de génotypes et pas le nombre d'allèles. L'observation de la répartition des populations dans l'arbre phylogénétique met en évidence deux résultats clairs ont pu être notés. D'une part toutes les souches de cidre et de fruits à noyaux sont dans le groupe phylogénétique B, répartis également dans les groupes B1 et B2. D'autre part, toutes les souches isolées de champagne sont dans le groupe A1, et en particulier dans les groupes A1a et A1d. Les souches isolées de vins rouge et blancs sont plus diversifiés et dispersées.

1.6.Relation entre l'année d'isolement et les groupes génomiques

Des groupes de souches ont été créés, isolés dans les périodes 1982-1989, 1990-1993, 1995-1999, 2000-2002, 2003-2006, 2007-2008. Ces groupes ont été créés arbitrairement, pour pouvoir à la fois intégrer le plus grand nombre de souches, et avoir des nombres d'individus suffisants pour chaque groupe. Les analyses de génétique des populations n'ont pas donné de résultats significatifs : les populations créées ne sont pas différenciées. Elles possèdent les mêmes valeurs de diversité allélique et génotypique, et n'ont pas pu être distinguées.

expérience	nom	gène	amorçe F	amorçe R	
1	<i>tyrXb</i>	tyrosine décarboxylase	ACATAGTCAACCATRTTGAA	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG	
	<i>hcbA</i>	histidine décarboxylase	CCWGGWAAWATVGGWAATGGWTA	AGACCATACACCATAACCTTG	
	<i>oob</i>	ornithine décarboxylase	AATAAGAGTTTACATTGGGGAA	TGAGTTTTCGACAGGTGCATT	
	<i>OEDE_0110</i>	bactériocine	CATATGTCTAATAAAAAATTTAACTGGTAAGT	GGATCCCTCATTITCCATTAAATTT	
	<i>OEDE_0306</i>	bactériocine	GTAGATAAAAAATAAAAGATAATTATTAATC	TTAGTGGTAGCGATGCTC	
	<i>cls</i>	citrate lyase synthase	CAATTTTAGTTTCGGCGGAAGTT	TTCAATCACCGTTTGATCAGA	
	<i>gnt</i>	glucosyltransferase	GATTGTAATAAAAAATAAAAGACCC	CATATGATAACACGCAGGGC	
	<i>hsp18</i>	Lo18	TGGATAGAAATGATGGATTAATG	TGATGAGTTTGACTTTTCGTGAG	
	<i>clpL</i>	ClpL2	CAAATGGCAAATATGCAACAAGC	CGTTTCATCGATCAAGTCG	
	<i>gus</i>	Glucan glucosidase	FCGGTAGTGCTCATGTCAATGC	ATCTGAGCTGTTTCTTTGCC	
	<i>gus</i>	Phosphoglucosidase	CTTTTAATGAGATCGACAACCA	GTCTTCTGAAACCGCATCGA	
	<i>gnt</i>		GGTCTCCGGGAACCGGTAATAAC	AATTGCATGGCCGGCTTCGTGATATGC	
	<i>omrA</i>	omrA	CAATATTGTGATTGCCAATATA	AAGATGAATTTTTTAAAGCTT	
	<i>trxA</i>	Thioredoxine	GCCACTTGGTGTACCCTTGT	TCAAATTTGCCGTTCTCGGTT	
	<i>arsB</i>	Anaerobic respirator control sensor	ATGGAAACAAAAGTTAGG	TTAAACATGCGGAATAAAC	
	<i>gstK-gstP</i>	esterase	GGCGGCCATATGTCAGAAATAGTTTTAAAA	CGGCCCTCGAGTCATTCTACTGATCTGTTA	
	2	NP_786655	cadmium transporting P-type ATPase	GAAGTCAAGATACCATCC	CGACTTGTGCACAGATTCC
		NP_786653	Dps ferritine	TTGGTTAATTCAGCCGTTGT	ATTGATCAGGATGTCCCAAC
		ZP_00069314	Polysaccharide biosynthesis export protein	CTCGTAGGCATGGTTCTCTC	ATTGGTTGATGAAAAATGG
		NP_786735	Maltose phosphorylase	ACGCATGATTCTCATATC	GGCTTTCAAATAACCATCG
NP_786661		transcriptional regulator	TGGCAACGCCTCAATCAAC	AGCTTACGGCTGATGCTTT	
NP_786185		Hypothetical protein lp-2814	TACTGTTCTGCAGCCGATGT	CTCCCGACAAACTGCTAATG	
ZP_00319390		predicted transcriptional regulator	CAATCAAGCCGGAAATAGTT	TGACCAGTTCGAATGAATTC	
ZP_00069318		Hypothetical protein	ATGACGCATTCTATATCCA	ATTTGCCGATAGTTTCTG	
ZP_00069144		Alcohol-sugar dehydrogenase	GGAAACAATTTACGCTTGC	CGGCCGTGTTGATAAGAA	
NP_786660		Copper chaperone	CCTCCTACTTAACCTTGACG	AGTCCCACTCTGTAATAAA	
ZP_00069147		Arabinose efflux protein MFS	TGGCTTAATCCCATCAGAAA	CCAAATGTCCAGAATACCG	
NP_786657		Thioredoxin	GTTTCTGAAGACTCCGCTTA	TGATGCCCCCTTCGTAAT	
NP_786656		Glycerol uptake facilitator protein	CTAAGCCATTCTGAAGAAC	CCCAACTATATCCAGTGA	
ZP_00069146		Arabinose efflux permease	TTTTACTGTCCAAGCAGGT	AATTAGAAGAAGCTGATAGCC	
ZP_00064025		Glycosyltransferase	TGTTAACGATACGAAGCGCG	GAATCACTCTCATTCCGACC	
NP_786654		Hypothetical protein lp-3433	AAATAACGCAGGCCAATC	CCAGTCTCGTTTACTGAG	
3		C23XPL	Na+/xyloside symporter related transporter	CCGAGGTTTCGCAGTAAGAAG	CCTCATATAAAGCCGCAAT
		A34Mefk	Macrolide-efflux protein	TTCTTTTAAAGCCGCCTACC	AACGCCAAAGAAACGAAAGA
		B5MarR	Putative transcriptional regulator, MarR family	TGTTATAAAGCAAGCTCGACCA	TACATGGCCGTTGTGATTTT
		B6abc	Putative drug ABC exporter	ACA AATGTGGCAGGCAATTC	GGCGACATCGGTAATGTTTT
	B15MarR	Transcriptional regulator, MarR family	TGATGGGAGAAATCGCAATG	CTACTGCGTCTGGGCTGTCT	
	C13TerR	Transcriptional regulator, TetR/AcrR family	AGGTGTTTAGCTTGGGCAAA	TAAAGGACCATTCGCGGTAA	
	C20MerR	Putative transcriptional regulator, MerR family	TGCTCTTTTCAAGTTTGGGTA	TGCGTTCAGCAGGTATGCT	
	A23Plys	Phage lysin	GAACACTGTTAATTTAGCAGTCGTTGAA	CAGCGGTAAAGACAAACCATT	
	C24conj	Conjugation protein	TCATTCAATCAGCTATTACGCACT	CAAGCCATATCAGCCACAAA	
	A36gnt	Glycosyltransferase	TTCCGAAAACAAGCAAAACC	TGCATACTGAGATTCTCTCCAA	
	A7	Acyl-CoA synthetase/AMP-acid ligase II	GTA CTGCTTGTAAATTGCCGCTTA	TTTTTCAGCACGTAAGTCTTTTT	
	B19phyto	Phytoene/squalene synthase	TTCTTCTTCTAGA ACTTCAAAATCA	GCTTAATGAAAATTCAAATTTAGCTG	
	A37C28	NAD(PAD)-dependant dehydrogenase	TCGTCACTGACCCAAAATGA	GACCCAAATGATTCACCGATA	
	B16quin	NADPH:quinone reductase oxidoreductase	TTTTGTTGACAAGAAACAATATATGC	TATCAGGGCTGACTATTGGTGT	
	B17	3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase	AAGTAGCAATAGTTACCGGCTCA	TACAGCATGTTTGGTCGCTGA	
	B21transR	Transcriptional regulator	CCGGGTAATCTGACACCCTA	GGGCCGGTAGCAATTTTTATT	
	C12	Permease, major facilitator superfamily	TACAGCGTCGTTGGTTTTGA	CCCACGATACTAATTGCCATA	
	C16	Hypothetical protein OEDE_0344	TCCGGTATGGAAGAGGCTAA	CGCCACGATAAACGTGAGTA	
	A32	Hypothetical protein	TACCGGAAAAATGGCAGAAC	TTATTAGCCACCGGCAAGAC	

Tableau 7 : Liste des gènes et marqueurs utilisés pour l'étude de présence/absence de locis. Le tableau a été divisé en trois parties pour distinguer les trois séries de marqueurs. Partie 1 : gènes de métabolisme et de stress. Partie 2 : marqueurs sélectionnés par comparaison des génomes de IOEB 1491 et IOEB 8413 (Delaherche 2006) partie 3 : marqueurs sélectionnés à partir de trois expériences de SSH in vivo entre les souches IOEB 277, IOEB 384, IOEB 450, VP41 d'une part, et IOEB 444 d'autre part (Bilhère, 2008)

1.7. Analyse de la présence de marqueurs génétiques

Afin de poursuivre l'étude de la diversité génétique de l'espèce *Oenococcus oeni*, la répartition de certains marqueurs dans la collection a été étudiée. Cette approche, complètement différente, ne repose plus sur des variations de séquence de gènes ubiquitaires, mais s'intéresse à la présence ou l'absence de gènes, qui pourraient apporter des avantages sélectifs aux souches. Trois séries de marqueurs ont été étudiés (tableau 7) : i) des gènes connus pour intervenir dans la réponse au stress ou dans des voies métaboliques ; ii) deux séries de gènes (ou régions génomiques) ressortant de la comparaison de génomes de plusieurs souches, soit par analyse bioinformatique, soit par hybridation soustractive.

1.7.1. Gènes de métabolisme et de stress

Un premier lot de 16 marqueurs (tableau 7, partie 1) a correspondu à des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire (décarboxylation d'acides aminés, métabolisme de l'arginine, activités osidases, estérases,...), ou des mécanismes de résistance au stress (*ftsH*, *omrA*, résistance aux bactériocines,...). Ils ont d'abord été recherchés par PCR chez 262 souches. Selon leur présence, on obtient seulement 26 configurations différentes sur les 262 souches, ce qui dénote d'une faible diversité pour ce point. Ce résultat est en partie dû au fait que les gènes choisis sont soit quasiment ubiquitaires (présents chez 98 à 100% des souches), soit au contraire quasiment absents (présents chez 0 à 3% des souches). Le nombre de marqueurs par souche varie entre 7 et 13 marqueurs. Les seuls gènes qui pourraient discriminer les souches sont les gènes *omrA* et *arcB*, retrouvés respectivement chez 34 et 209 souches. Il est à noter que seules les souches du groupe phylogénétique A avaient le gène *omrA*. Une vérification sur le gène *omrA* montre qu'en réalité les amorces utilisées dans la première série ne convenaient pas. L'analyse a été renouvelée et a abouti à la conclusion que ce gène est présent chez toutes les souches. La relation initialement trouvée entre la présence d'*omrA* et le groupe phylogénétique pourrait

être due à la divergence des génomes entre A et B, de sorte que l'hybridation des amorces s'avérait impossible pour celles du groupe B.

En tout cas, les résultats n'ont permis aucune association entre le génotype et la présence de marqueurs. De même l'étude de chaque marqueur n'a pas montré de corrélation avec aucune population.

1.7.2. Genès issus de la comparaison des génomes de IOEB

8413 et IOEB 1491

Dans un deuxième temps, une autre série de 16 gènes a été étudiée, dont la présence a été recherchée chez les 282 souches de la collection (tableau 7, partie 2). Ces gènes ont été retenus, leur présence en grand nombre ayant précédemment été associée à une performance œnologique (Bon et al., 2009). Parmi les marqueurs sélectionnés, sept sont physiquement liés sur le génome, marqués en gras sur le tableau, dans une région d'ADN de 7 kb.

L'étude de la présence de ces marqueurs a été réalisée par hybridation ADN/ADN en déposant l'ADN génomique sur une membrane en cellulose. Chacun des fragments visés a servi à préparer une souche marquée. Une grande diversité de profils a été observée, avec 133 profils différents. Aucun marqueur ne s'est avéré être présent ou absent partout. Selon le marqueur, il est retrouvé chez 9 à 84% des souches. Cette diversité est chiffrée par le calcul d'indices de génétique de populations. Elle est comparée à celle décrite dans l'étude MLST.

Les populations géographiques ont des indices de diversité similaires, excepté pour la population chilienne, dont la diversité est plus faible. Ce résultat rejoint ceux de la MLST. Par ailleurs, la variation de la présence des gènes n'est pas liée aux groupes phylogénétiques.

Le nombre de marqueurs dans chaque souche a distingué les souches du groupe A de celles du groupe B. Le nombre moyen est plus élevé chez les souches du groupe phylogénétique A (5,2 marqueurs/souche) que chez les souches du groupe B (3,6 marqueurs par souche). Cette différence n'est cependant pas statistiquement significative ($p > 0,05$). Dans

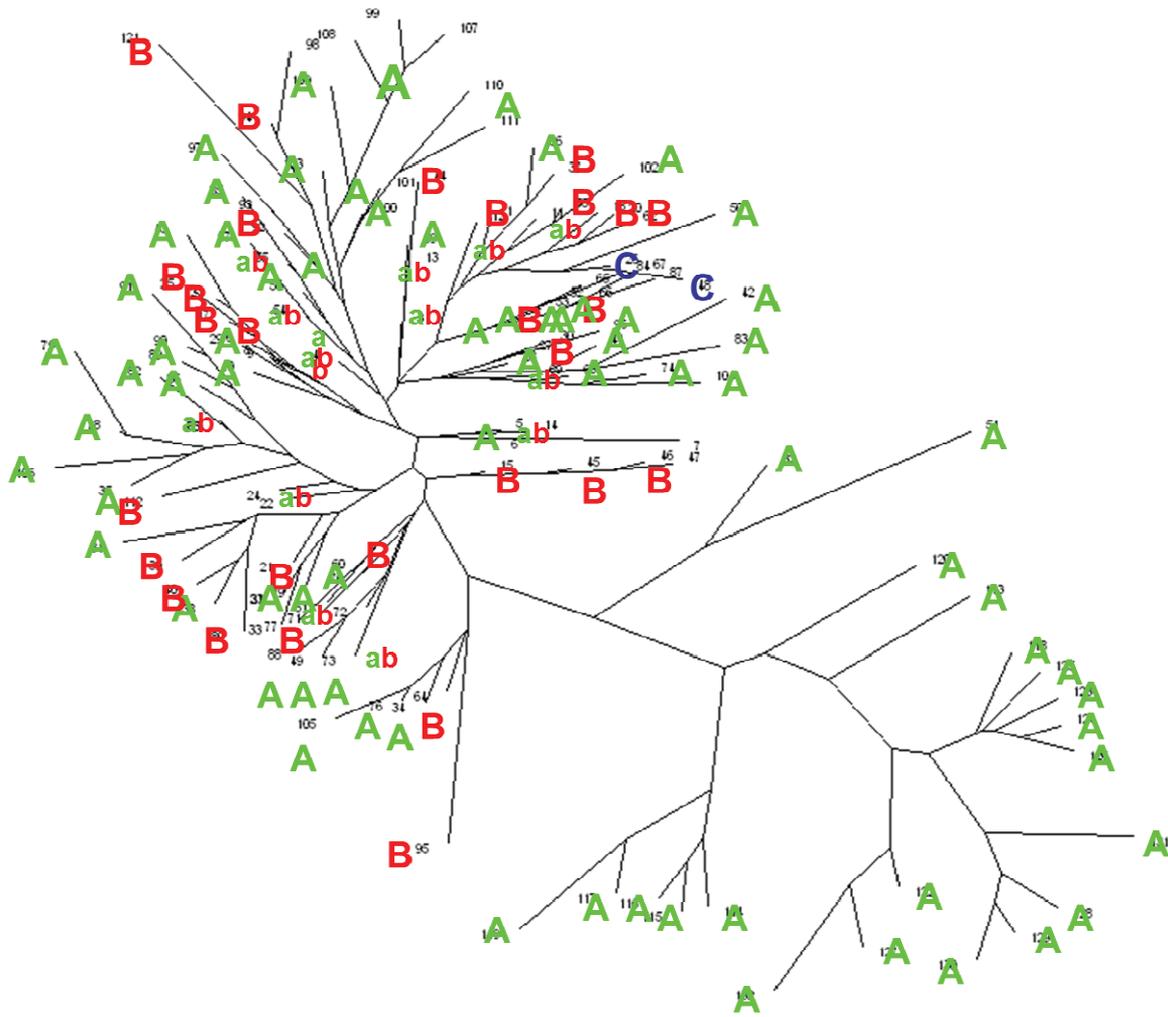


Figure 17 : Dendrogramme des 282 souches de la collection, en fonction du profil de présence/absence des marqueurs issus de la comparaison génomique IOEB 8413-IOEB1491. L'appartenance aux groupes phylogénétiques A, B et C de chaque profil a été annoté.

le groupe B, les souches possèdent entre 0 et 8 marqueurs, et dans le groupe A, entre 0 et 15 marqueurs. Un petit groupe de 30 souches, toutes appartenant au groupe phylogénétique A et portant un nombre important de marqueurs, fait la différence du nombre moyen de marqueurs par souche entre A et B. Ce résultat est également visible dans le dendrogramme réalisé, visant à différencier les profils entre eux (figure 17). Une branche se démarque clairement des autres, correspondant aux souches possédant un nombre important de marqueurs. C'est la présence du fragment de 7 kb (gènes marqués en gras dans le tableau 7), uniquement chez certaines souches du groupe A, qui est principalement responsable de l'augmentation du nombre de marqueurs. Il n'y a pas d'autre différence claire entre les souches des groupes phylogénétiques A et B. Par ailleurs, les deux souches du groupe phylogénétique C, même si elles ne sont pas différenciées des autres souches, ont la particularité de n'avoir que peu de marqueurs.

Ce résultat démontre encore une fois une différence entre les souches des groupes phylogénétiques A et B, qui peut cette fois-ci être reliée à une différence phénotypique. En effet, la présence d'un nombre plus élevé de ces marqueurs a été supposée antérieurement liée à une meilleure performance œnologique (Bon et al., 2009). Comme ils sont plus présents chez des souches du groupe A, cela conduirait à l'hypothèse qu'elles sont mieux adaptées aux conditions du vin. Il faut d'ailleurs remarquer que les levains malolactiques sont majoritairement en A dans l'arbre phylogénétique. Ceci pourrait être donc intéressant dans la sélection future de levains, où il serait judicieux de se focaliser essentiellement sur ces souches.

1.7.3. Recherche de gènes choisis après hybridation soustractive

Les travaux effectués par Eric Bilhere dans sa thèse (Bilhere, 2008) ont permis d'obtenir une liste de gènes faisant la différence entre plusieurs génomes. La méthode utilisée

était l'hybridation soustractive (SSH). Les ADN génomiques des souches à comparer sont digérés puis hybridés. Le protocole permet de récupérer les régions d'ADN uniquement présentes chez une souche. Trois séries de SSH ont été réalisées, la première en hybridant les ADNs de 4 souches de bonne qualité œnologique (IOEB 277, IOEB 384, IOEB 450, VP41), avec une mauvaise (IOEB 8413), et les deux autres en faisant la soustraction entre génomes de deux bonnes souches (IOEB 277 et IOEB 450), chacune servant à son tour de référence. Le nom des gènes a été codé, à partir de l'expérience de SSH de laquelle ils ont été tirés (A pour la première SSH, B pour les gènes présents chez la souche IOEB 277 et C pour les séquences de IOEB 450). Une liste de 112 gènes, ou séquences, présents chez les souches œnologiquement performantes a été obtenue, à partir de laquelle nous en avons retenu 19 (tableau 7, partie 3), en raison de leur fonction cellulaire supposée, mais également en tenant compte de leur fréquence dans les souches étudiées. Les fragments présents chez les quatre souches performantes n'ont pas été retenus. Aucune donnée n'a encore prouvé l'importance et le rôle de ces gènes dans l'adaptation au vin. Mais l'on fait l'hypothèse qu'ils peuvent être impliqués puisque seulement présents chez les bonnes souches. Bien que rien ne le démontre réellement, ils sont susceptibles de donner des avantages sélectifs.

Ces gènes ont été recherchés chez les 282 souches de la collection, par PCR en temps réel. A cause de problèmes de PCR, 3 souches n'ont pas pu être analysées, et donc l'étude a porté au final sur 279 souches.

Au total, 115 profils différents sont obtenus, ce qui dénote d'une diversité génotypique importante. Les 19 marqueurs, issus des trois SSH, sont tous présents au moins dans une souche de la collection, mais jamais dans toutes. Le marqueur le moins fréquent, est présent uniquement chez 19 souches, alors que le marqueur le plus fréquent l'est chez 221 souches.

L'association de ces gènes à d'autres caractères a été recherchée, pour savoir si ceux-ci peuvent éventuellement servir de marqueurs de sélection efficaces. Une question était de

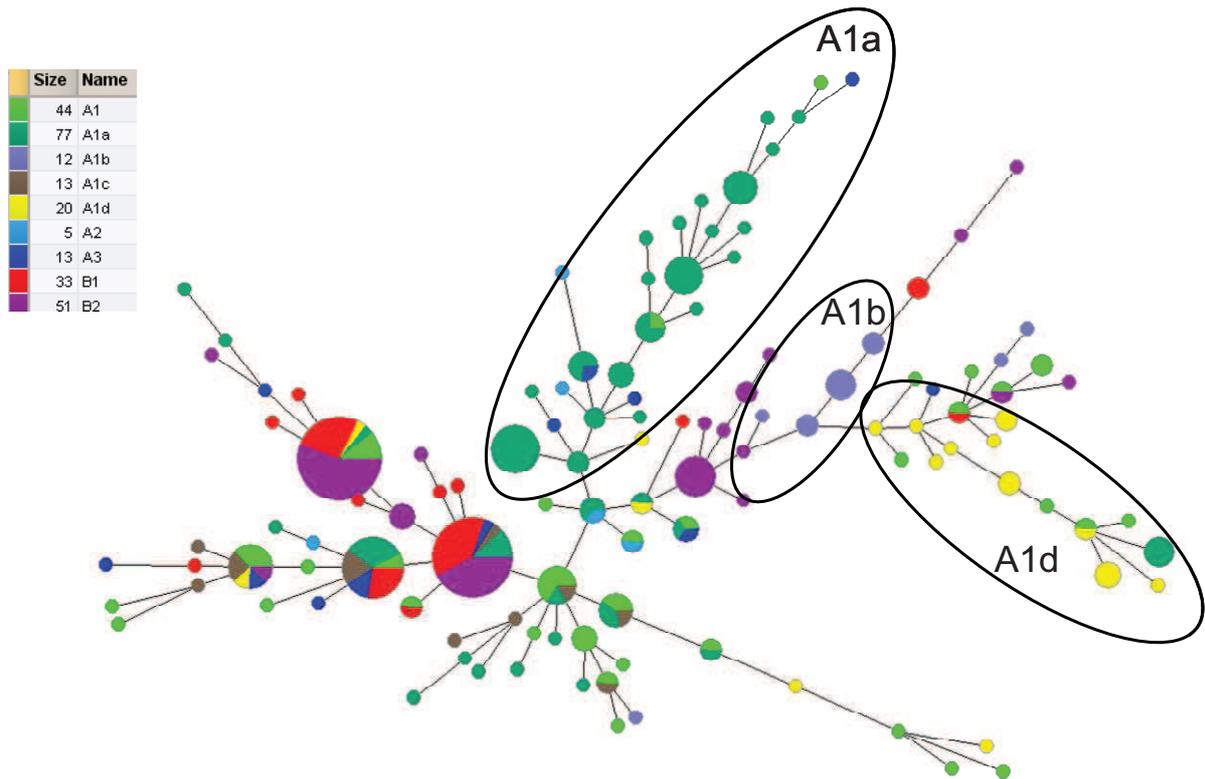


Figure 18 : Minimum spanning tree des souches en fonction de leur profil génotypique de présence de gènes issus de. Chaque cercle correspond à un génotype. Le diamètre des cercles est proportionnel au nombre de souches avec ce génotype. Les couleurs sont associées aux groupes phylogénétiques auxquelles les souches sont rattachées.

savoir si ces marqueurs pouvaient discriminer les souches de la même façon que la phylogénie, et si ces gènes pouvaient être en relation avec des origines géographiques précises, ou des types de matrice. Des MANOVAs ont été réalisées.

La recherche de l'association des marqueurs avec le type de produit (Vin rouge, Vin blanc, champagne, cidre, Poiré, fruit à noyau) n'a pas donné de résultats significatifs, excepté pour la population de champagne. Cependant, l'analyse plus fine de cette population montre que seules les souches du groupe phylogénétique A1d sont différentes. Il semble donc que le type de produit n'influe pas sur la répartition des marqueurs, la phylogénie a un impact plus fort. Le même type de résultats est observé en analysant l'association entre la présence de marqueurs et l'origine géographique. Les seules souches qui se démarquent sont encore une fois certaines souches champenoises et bourguignonnes.

Le groupement phylogénétique paraît être relié à la présence de ces marqueurs de SSH. La MANOVA aboutit à la distinction des populations de souches des groupes phylogénétiques A1a, A1b et A1d. Ces groupes sont associés à des marqueurs spécifiques, surtout pour les souches du groupe phylogénétique A1d, qui sont les seules à présenter en nombre important les marqueurs de la troisième expérience de SSH (expérience C). Un minimum spanning tree construit montre bien la discrimination des génotypes de ces trois groupes phylogénétiques (figure 18).

La diversité de répartition des gènes pour des populations des groupes phylogénétiques A et B a été comparée. Curieusement, la diversité génotypique des souches du groupe B est très faible, avec deux génotypes largement majoritaires. Les groupes phylogénétiques B1 et B2 ne semblent pas différenciés, excepté pour 12 souches du groupe B2 (toutes de cidre) qui ont des profils atypiques. Ce résultat, en contradiction avec les résultats MLST, est cependant en accord avec l'étude de recherche des marqueurs de la série 2 venant de la comparaison 8413/1491. Les souches du groupe A portent beaucoup plus de marqueurs, et leur mélange donne un nombre important de génotypes.

1.8. Discussion.

1.8.1. Confrontation des résultats de typage par PFGE et MLST

Les deux méthodes de typage, restriction génomique par électrophorèse en champ pulsé et MLST, ont donné toutes des résultats proches, dénotant chez *O. oeni* une évolution génétique importante et une grande diversité. L'analyse REA-PFGE met en évidence des grands réarrangements chromosomiques, représentatifs d'événements majeurs, probablement à cause de changements de physiologie. L'analyse par MLST s'attache aux variations de séquences, les SNP (single nucleotide polymorphism). Elle différencie efficacement les souches. Ces deux méthodes, bien que basées sur des principes très différents, séparent la collection en deux groupes, et les mêmes groupes A et B sont délimités. En revanche, les sous-groupes phylogénétiques sont différents. Les sous-groupes A1a, A1b, A1c, A1d, bien distincts dans l'analyse MLST, ne sont pas observés en REA-PFGE. Toutefois, la REA-PFGE reste à ce jour l'analyse la plus fine car elle fournit le plus grand nombre de profils pour la même collection. Chaque méthode a donc son intérêt propre et donne des informations de nature différente.

1.8.2. Deux sous-populations évoluant séparément

Dans la littérature, plusieurs travaux ont démontré l'existence des deux sous-populations, par utilisation de différentes méthodes (REA-PFGE, MLST, RAPD, et ribotyping)(Bilhere et al., 2009; De Las Rivas et al., 2004; Larisika et al., 2008; Zavaleta et al., 1997). Cependant le faible nombre de souches utilisé dans ces études était insuffisant pour tirer des conclusions sur la structure génétique de l'espèce *O. oeni*, bien que les auteurs suggèrent l'existence de deux sous-populations.

Dans cette étude la collection réunie était d'une part importante en nombre, et diverse (géographie, type de produit) et plus représentative de l'espèce. L'existence des 2 sous-populations peut être avancée avec plus de sécurité. Pour cinq des sept loci de la MLST, les arbres phylogénétiques spécifiques révèlent deux groupes d'allèles. Cette séparation en deux sous-populations ne porte pas sur un petit nombre de loci, mais sur l'ensemble du génome. Pour les deux autres loci, la situation est différente. Pour *pgm*, les séquences étaient très conservées, pas suffisamment divergentes pour permettre la formation de deux groupes. A l'inverse *recP* était tellement variable (en partie dû à de multiples événements de recombinaison intragénique) que cela a provoqué un brassage génétique intense empêchant de voir la dualité groupe A/groupe B. Grâce à la construction des arbres en split décomposition, il a été prouvé que pour chaque locus, les allèles des souches trouvés dans les groupes A et B évoluent par addition de mutation, séparément, sans recombinaison intragénique, sauf encore une fois pour *recP*. Chaque groupe phylogénétique a ses propres allèles et présente une évolution linéaire. Par ailleurs, aucun événement de recombinaison n'a été observé entre allèles de souches du groupe A et des souches de B. une exception est *dnaE*, où la recombinaison d'allèles du groupe A et B ont donné des allèles trouvés dans des souches de cidre. La seule autre exception est encore une fois chez *recP*.

En fait les groupes A et B sont très bien différenciés, ce qui suggère qu'ils ont évolué séparément, avec peu d'échange de matériel génétique. A l'inverse, dans chaque groupe, les échanges génétiques semblent être fréquents. La recombinaison intergénique joue un rôle important dans la diversité génétique et l'apparition de nouveaux génotypes.

Les deux populations correspondent à des origines différentes. Les souches de cidre sont exclusivement comprises dans le groupe B, alors que les souches de Champagne et Bourgogne sont dans le groupe A. Le fait que les échanges génétiques entre ces deux groupes sont limités est une autre preuve en faveur de la divergence entre les deux groupes. Par

conséquent, Dans ce contexte, nous pouvons suggérer la reconnaissance de ces deux sous-populations, en deux sous-espèces.

1.8.3. Un troisième groupe phylogénétique

Une souche (DIV 5.7), isolée à partir de cidre, forme à elle seule un troisième groupe phylogénétique. Sa séquence concaténée est très différente des autres. Plus de 300 mutations ont été trouvées quand on compare sa séquence avec celle des autres souches, et plus de 600 bases de différence ont été trouvées avec certaines souches du groupe A. Ces mutations sont distribuées dans l'ensemble des loci, sauf chez *pgm* et *dnaE*, et des allèles spécifiques et très divergents ont été trouvés. C'est la seule souche dans la collection (avec DIV 5.30 non retenue à cause de l'impossibilité à amplifier *dnaE* chez cette souche) chez laquelle ces allèles spécifiques ont été trouvés (pour les locus *gyrB*, *g6pd*, *purK* et *rpoB*). Des allèles divergents de *recP* ont également été séquencés, mais détectés chez d'autres souches de cidre (sept souches) et de vin (deux souches d'Italie et Allemagne, isolée de fruit à noyaux). Ces allèles ont des pourcentages de similarité relativement faibles (85% d'identité) par rapport aux autres allèles d'*O. oeni*, ce qui pourrait mettre en doute l'appartenance de cette souche à l'espèce *O. oeni*. Cependant cette souche est bien de l'espèce *O. oeni*, vérifié grâce à l'analyse de la séquence 16S, identique à plus de 99%. Il est ainsi possible que cette souche ait muté de façon très importante pour former un nouveau groupe phylogénétique. Comme il n'existe pas de séquences intermédiaires entre ces allèles particuliers, il est possible que leur existence soit due à un transfert horizontal avec une autre espèce bactérienne. Cette hypothèse est en accord avec l'absence du MMR (mutation mismatch repair) chez *O. oeni*, ce système de réparation de l'ADN qui prévient l'incorporation d'hétéroduplex, et provoque entre autres une réduction de recombinaison inter-espèce. L'alignement et le BLAST de ces séquences divergentes n'a pas permis de découvrir leur origine potentielle. Il n'est pas possible actuellement de déterminer s'il y a eu vraiment transfert, et à partir de quelle espèce. La seule indication est

obtenue pour l'allèle de *rpoB* (89% d'identité avec les autres allèles d'*O. oeni*), qui est à 77% identique avec la séquence *rpoB* de *Lactobacillus johnsonii*.

1.8.4. Des sous-populations dans chaque groupe

Au sein des deux groupes phylogénétiques A et B, des sous-groupes sont apparus, avec des particularités intéressantes. Certaines souches du Chili forment un groupe phylogénétique spécifique (A1b), distinct des autres que ce soit dans l'arbre phylogénétique, le minimum spanning tree et les autres analyses génétiques. Ce sous-groupe inclut aussi deux souches isolées en Australie, une en Grèce, et deux en France. Le faible niveau de mutations, environ 10 pour toute la séquence concaténée, indique que les souches du groupe A1b et les autres du groupe A sont très proches. Cependant, ces 10 mutations sont réparties sur tous les loci dans la séquence concaténée, donnant des allèles nouveaux pour chaque locus. Ceci indique quand même une différence génétique importante, même si le nombre de mutations est très faible.

La même chose a été observée pour 9 souches sud-africaines qui forment le groupe A1c, avec une souche de Grèce et deux souches d'Aquitaine. Dans ce cas-là, à cause de l'absence de nouveaux allèles, ce n'est pas l'apparition de SNP, mais plutôt la recombinaison intergénique qui a probablement été à l'origine de nouveaux allèles, et donc de ces nouveaux génotypes.

Les souches de Champagne et de Bourgogne sont également particulières. Certaines souches sont dans le sous-groupe A1d, créé essentiellement par l'insertion d'un élément transposable dans *purK*. Cependant, les allèles chez les autres gènes sont également spécifiques à ce groupe. La diversité génétique de ces groupes, est plus faible qu'ailleurs, autant en calculant la diversité allélique que génotypique. Toutes les souches sont réparties dans le groupe A, dans deux sous-groupes (A1a et A1d). La ressemblance entre les populations de Champagne et de Bourgogne est intéressante à noter, et pourrait être corrélée à l'environnement naturel de ces régions, et de leurs vins qui sont plus acides.

Parmi les 7 populations étudiées, les souches sud-africaines, aquitaines, et italiennes sont les plus diverses et les moins différenciées. Elles sont dans presque tous les génotypes. Ceci suggère que la diversité dans ces populations pourrait être représentative de la diversité de l'espèce. Certaines populations sont spécifiques pourrait être le résultat d'une adaptation et prolifération de génotypes particuliers. Un évènement fondateur par implantation dans la région aurait donc pu être à l'origine de la structure génétique particulière de ces populations. Ceci est le cas en Afrique du Sud, au Chili et en Champagne et Bourgogne, où la majorité des souches font partie de sous-groupes phylogénétiques distincts. Cependant, pour la population chilienne, il faut relativiser la conclusion car les souches ont été prélevées uniquement dans deux régions. De même, pour la population allemande, la plupart des souches sont issues de fruits à noyaux. Si la diversité en Allemagne n'est effectivement sans doute pas bien représentée, cela souligne la spécificité des bactéries isolées de fruits à noyaux.

La population isolée de cidre est également originale. Ces souches sont présentes uniquement dans le groupe B, bien réparties aussi dans le minimum spanning tree, elles forment une population à part, avec des allèles spécifiques. Elles sont caractérisées par 23 ST, dont 6 uniquement pour des souches de cidre. La population cidricole est bien différenciée des autres avec un θ supérieur à 0,3. Ce résultat est cohérent avec l'étude de REA-PFGE, où les souches de cidre sont également bien éloignées des autres. Les souches issues d'autres fruits que le raisin (comme le poiré, et les fruits à noyaux, sont également groupées en B. Finalement, une hypothèse pourrait être que les souches du groupe A sont spécifiquement adaptées aux conditions du vin. Cette hypothèse coïncide d'ailleurs avec le fait que 8 des 9 levains malolactiques analysés sont dans le groupe phylogénétique A.

1.8.5. Les marqueurs génétiques dans la sélection de souches œnologiques

L'étude de la présence de 51 marqueurs dans la collection a donné des résultats variables, selon la série de marqueurs employés. D'une part, la première série de marqueurs, des gènes de métabolisme ou impliqués dans une réponse au stress n'a pas montré de variabilité génétique importante. Les deux autres séries de marqueurs, isolés d'une part d'une comparaison *in silico* de génomes, et d'hybridations soustractives d'autre part, ont montré une diversité de génotypes bien plus importante. L'utilisation de ces marqueurs pour le criblage n'était pas anodine puisque leur présence est potentiellement corrélée à une bonne performance œnologique. L'étude des deux dernières séries de marqueurs a montré des résultats similaires pour les deux expériences. Même si la variabilité est importante, peu de souches portent finalement un grand nombre de marqueurs. La prépondérance des marqueurs de la deuxième série dans la performance œnologique a déjà été prouvée statistiquement, et il a même été montré que les levains malolactiques testés présentaient un grand nombre de ces marqueurs. En ce qui concerne la troisième série de marqueurs, rien n'est confirmé, même si la provenance de ces marqueurs (issus de bonnes souches et absents chez une mauvaise souche) autorise à penser qu'ils pourraient apporter un avantage sélectif.

Quoi qu'il en soit, le résultat concordant entre les deux expériences est la prépondérance du nombre de marqueurs, chez des souches du groupe phylogénétique A. Il semble donc que sur ces critères, les souches de ce groupe sont les mieux adaptées aux conditions difficiles de la vinification. En outre, la présence des levains malolactiques dans ce groupe phylogénétique A est le premier des indices dans l'hypothèse que les souches du groupe A sont mieux adaptées aux conditions du vin. Malheureusement, à part leur présence en quantité, il n'y a pas de marqueur en particulier qui puisse être associé à un groupe phylogénétique ou une région géographique, excepté certaines souches de Champagne qui

sont différenciés par des génotypes particuliers. Ces marqueurs ne semblent donc pas utiles pour le typage génétique.

PARTIE 2 :
ETUDE DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE DE L'ESPECE
OENOCOCCUS OENI

	origine géographique	produit d'isolation	groupe phylogénétique
VF	Souche commerciale		A1
B16	Souche commerciale		A1
DIV 7.35	Italie		A1
DIV 7.113	USA		A1
IOEB 0205	France, Champagne	Vin rouge	A1
PSU-1	USA		A1a
DIV 6.51	France, Champagne	Vin rouge	A1a
DIV 7.27	Italie		A1a
DIV 7A.2	France, Bourgogne	Vin blanc	A1a
DIV 7A.25	France, Bourgogne	Vin rouge	A1a
DIV 7.73	Australie		A1b
V15-1	Chili	Vin rouge	A1b
SABO 11	Afrique du sud	Vin rouge	A1c
DIV 6.27	France, Champagne	Champagne	A1d
BLO1	France, Champagne		A1d
DIV 7.124	Italie		A1d
DIV 10.7	France, Aquitaine	Vin blanc	A2
DIV 7.163	Italie		A3
DIV 10.10	France, Aquitaine	Vin rouge	A3
DIV 7.106	Allemagne		B1
IOEB 0502	France, Centre	Vin rouge	B1
IOEB 8908	France, Aquitaine	Vin rouge	B1
ATCC-BAA 1163	France, Aquitaine	Vin rouge	B2
DIV 7.32	Italie		B2
DIV 7.121	Brésil		B2
DIV 7.184	Allemagne	Fruits à noyaux	B2

Tableau 8 : Liste des souches retenues pour l'étude phénotypique

2. Etude de la diversité phénotypique dans l'espèce

Oenococcus oeni

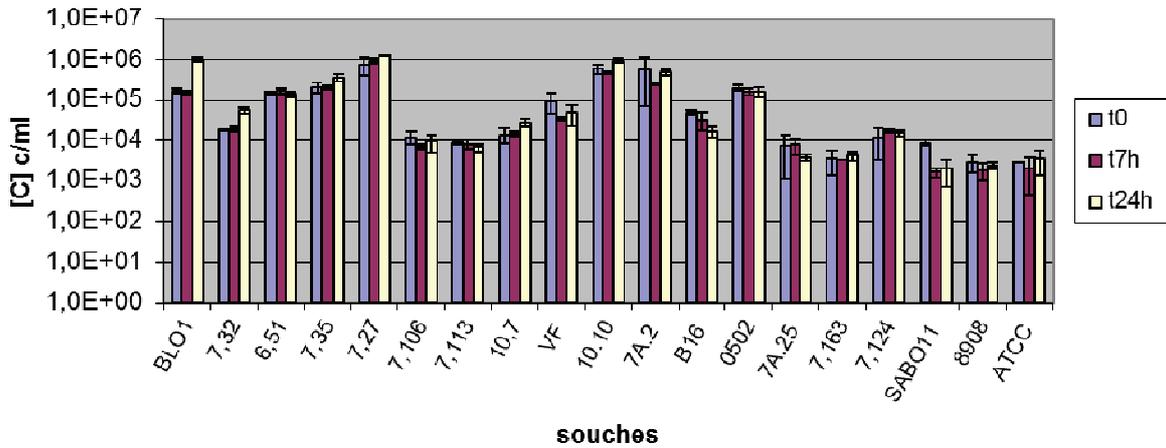
L'étude phénotypique de l'espèce *Oenococcus oeni* est également un objectif majeur de cette étude, car certains caractères sont un critère fondamental dans la sélection des levains malolactiques. La capacité de croissance, de survie, de formation d'une biomasse suffisante, mais aussi la vitesse de croissance sont autant de paramètres à considérer dans la sélection de levains. De nombreuses études phénotypiques ont déjà été menées, visant à connaître mieux le comportement de ces bactéries, mais toujours menées sur un nombre restreint de souches, en raison de la lourdeur des expérimentations. Dans ce travail, nous nous sommes attachés à mettre en œuvre des protocoles adaptés à l'étude de toute la collection typée par MLST. Les caractères examinés sont successivement l'aptitude à se multiplier en milieu acide et alcoolisé, puis la capacité à fermenter divers sucres.

2.1. Etude préliminaire

L'étude préliminaire porte sur 26 souches choisies en fonction de leur localisation sur l'arbre phylogénétique de la figure 10, afin de travailler sur les plus génétiquement diverses. Les souches sont présentées dans le tableau 8. Cette étude avait pour but de faire une première estimation de la diversité phénotypique, et de la comparer à la diversité génétique. Par ailleurs, les résultats ont été utilisés pour choisir les 7 souches qui feront l'objet de l'étude transcriptomique.

La survie aux conditions de stress a été effectuée après quelques heures, afin d'estimer le taux de cellules survivant. Chaque souche a étéensemencée à une concentration de 10^8 cellules par ml dans un milieu MRS dans lequel le pH et la concentration en éthanol ont été ajustés, ou dans du vin. Trois milieux ont été testés, en triplicat. Un milieu MRS à pH 4,8, 0% éthanol, un milieu MRS pH 3,4 et 0% éthanol, et un milieu MRS pH 4,8 et 10% éthanol. La

19A Concentration des populations à pH 3,4 après 24h



19B Concentration des populations à 10%EtOH après 24h

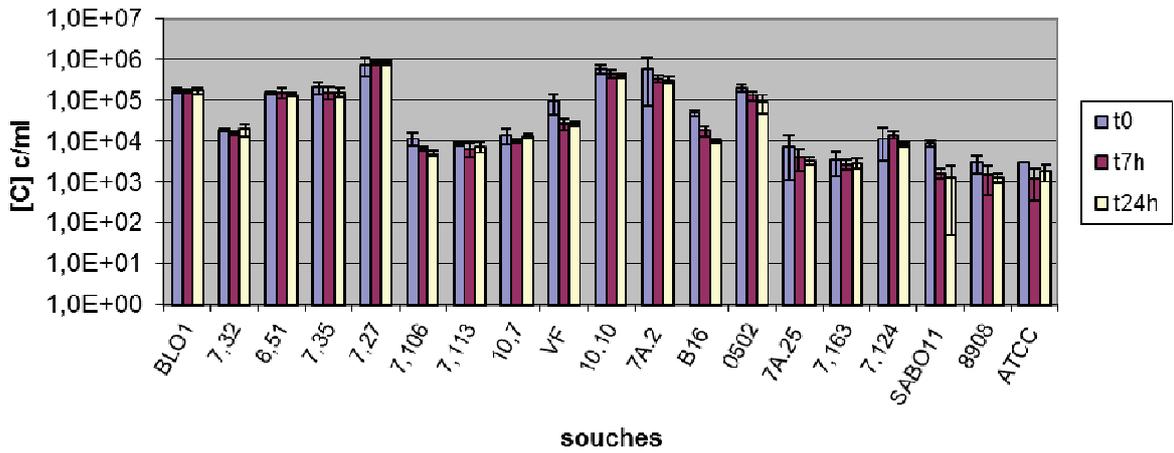


Figure 19: Concentration de population de 19 souches après 0, 7 et 24h dans les milieux modifiés. La figure 19A montre les résultats du stress en milieu acide (pH 3.4), la figure 19B représente les résultats du stress éthanol (10%)

concentration cellulaire a été mesurée par étalement sur boîtes de milieu MRS gélosé à pH 4,8. Les prélèvements de culture ont été faits à t_0 , après 2 heures, après 7 heures et enfin après 24 heures de culture. Pour chaque prélèvement, plusieurs dilutions ont été effectuées pour avoir moins de 100 colonies par dénombrement sur milieu nutritif. L'évolution de la biomasse a donc pu être mesurée et un rapport entre la concentration à différents temps et la concentration à t_0 a pu être calculé, pour pouvoir comparer les phénotypes des souches. La population a été suivie pendant deux semaines, par mesure de densité optique. Les conditions des milieux ont été créées dans le milieu MRS dont le pH (à 4,8 et 3,4) et la concentration en éthanol (0% et 10%) ont été modifiés.

Sur les 26 souches, seulement 19 souches ont donné des résultats exploitables (figure 19A). Les 7 autres souches ne se sont pas multipliées dans ce milieu standard (0% éthanol et pH 4,8). Pour les 19 souches, globalement la survie de souches en stress acide est bonne, avec en moyenne une bonne croissance dans les milieux stress (70% de la biomasse formée en milieu standard). Certaines souches se démarquent parce que non seulement elles survivent bien dans ces milieux, mais aussi se multiplient. C'est le cas de BL01 et DIV 7.32. De même, une bonne survie a également été observée après l'inoculation en présence de 10% d'éthanol (figure 19B).

La croissance de ces souches a également été suivie, sur une période de deux semaines, par mesure de DO. Quel que soit le milieu, malgré une apparente survie, les souches ne se multiplient pas. Deux souches seulement ont vu leur population augmenter à 10% d'éthanol (DIV 7.27, DIV 10.10), et deux autres souches, dans le milieu à pH 3.4 (BL01, DIV 7.32).

D'après ces premiers résultats, le comportement des souches est globalement le même. Toutefois, certaines parviennent à tolérer les conditions imposées. Parmi elles, nous avons pu en sélectionner 5 pour l'étude transcriptomique. Ce sont les souches BL01 et DIV 7.32,

capables de survivre et croître dans des milieux acides, la souche SABO11, qui à l'inverse semble la moins résistante, la souche PSU1 (souche de référence), et la souche DIV 10.7

2.2. Etude de la capacité de croissance des souches

Afin de tenter de relier génotype et phénotype, toute la collection typée par MLST a été utilisée. Cela représente donc 282 souches, qui ont été cultivées en triplicat pour chaque souche dans chacun des 9 milieux, ajustés à 3pH et 3 titres alcoométriques. Le nombre d'échantillons étant trop élevé pour une étude classique, nous avons fait appel à la plateforme de phénotypage de la SFR de biologie intégrative. Les cultures sont réalisées en volumes de 100µl dans les puits de microplaque. Les ensemencements ont été effectués par un robot pipeteur. Au total, ce sont 7614 cultures qui doivent être suivies. La croissance était mesurée par l'augmentation de la DO à 600nm.

2.2.1. Choix du milieu de culture

Les milieux choisis pour cette étude de phénotypage à grande échelle sont restés relativement simples. Ils devaient assurer la croissance des souches, mais aussi des différences en fonctions des paramètres variables. Dans le vin, de nombreux facteurs influencent la croissance des bactéries dont les principaux sont l'acétate, le titre alcoométrique, la température et la concentration en SO₂. Les deux facteurs les plus déterminants ont été choisis : ce sont la concentration en éthanol et le pH.

Le milieu de base le plus évident à utiliser était le milieu MRS, le plus employé au laboratoire pour la culture d'*O. oeni*. Cependant, dans une première série de mesures, de nombreuses souches ne se sont pas multipliées dans les conditions de culture. C'est pourquoi plusieurs milieux ont été testés, comme le MRS, le milieu jus de raisin, et le milieu EBL (jus de raisin, supplémenté de glucose, peptone de soja, extrait de levure, MgSO₄, MnSO₄) (Renouf, 2006). Sept souches ont été choisies pour ce test (DIV7.42, DIV7.1, SABO41,

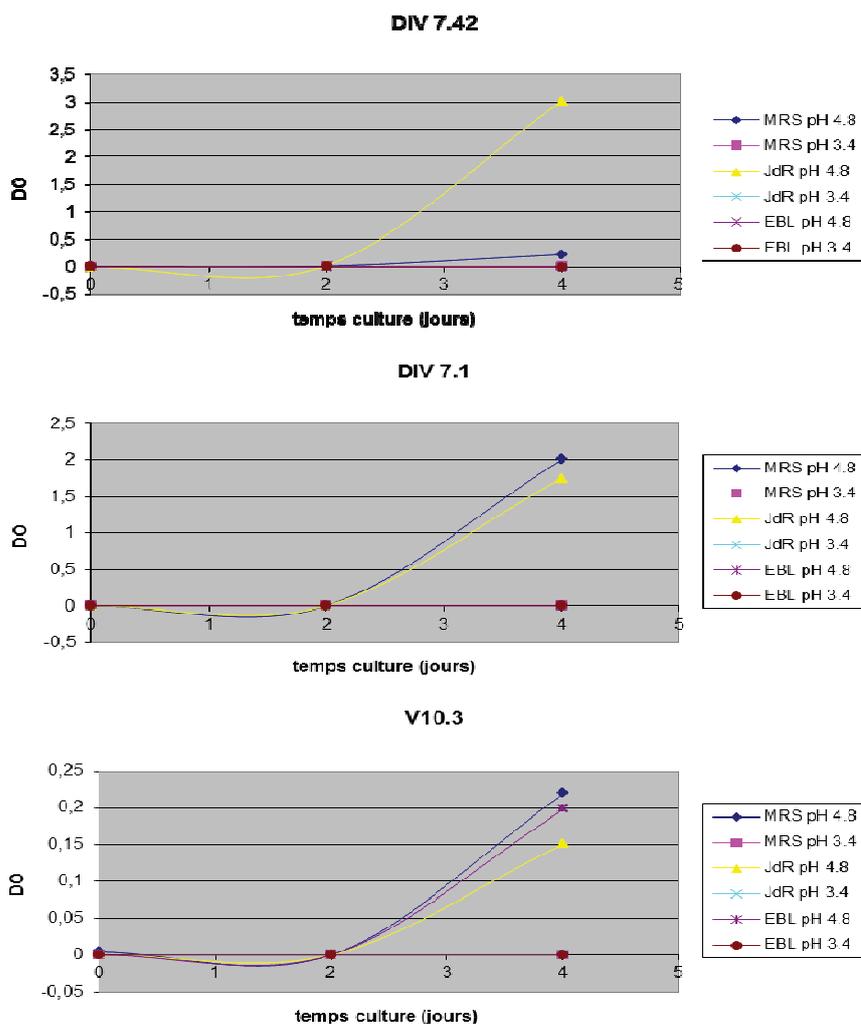


Figure 20 : Courbes de croissance des souches DIV 7.42, DIV 7.1 et V10.3 dans six milieux de culture, en fonction du temps.

	moyenne	écart type	valeur maximale	valeur minimale
pH 4.8 6%EtOH	105,76%	0,44	224,67%	4,79%
pH 4.8 12%EtOH	35,70%	0,33	150,58%	0,12%
pH 4 0%EtOH	92,43%	0,29	175,02%	20,68%
pH 4 6%EtOH	120,25%	0,52	347,55%	3,75%
pH 4 12%EtOH	49,19%	0,46	211,26%	0,00%
pH 3.4 0%EtOH	67,07%	0,28	161,20%	9,12%
pH 3.4 6%EtOH	86,70%	0,44	225,39%	0,00%
pH 3.4 12%EtOH	29,40%	0,3	154,38%	0,00%

Tableau 9 : Valeurs de rapports de biomasses de l'ensemble des souches, dans chaque milieu de culture, pour lesquels les conditions physicochimiques ont été précisées. La moyenne, écart type, valeur minimale et maximale ont été calculées

DIV7A.6, V10.3, DIV5.75, DIV5.28), en raison de leur éloignement phylogénétique. Elles ont été ensemencées dans ces 3 milieux, où le pH était ajusté à 4,8 et 3,4. La croissance a été mesurée par DO600 et bioluminescence (ATP-métrie). Dans les milieux à pH 3,4, la multiplication a été difficile pour toutes les souches, pour tous les milieux. Par ailleurs, à pH 4,8, les souches avaient des comportements différents selon le milieu (figure 20). En particulier, certaines souches incapables de se multiplier dans du MRS classique et milieu EBL, se développaient toutes dans le milieu jus de raisin (figure 20). De plus dans ce dernier milieu, la croissance était assez proche, avec la même quantité de biomasse formée quelle que soit la souche.

C'est donc le milieu Jus de raisin qui a été retenu pour l'étude en haut-débit de phénotypage. Le pH a été ajusté, à trois valeurs différentes, pH 4,8 (condition de culture standard), pH 4 et pH 3,4. La concentration en éthanol a également été ajustée à 0% (condition standard) 6% et 12%. Au total neuf milieux différents ont été préparés en associant ces différentes conditions.

2.2.2. Influence du pH et de l'éthanol sur la croissance des souches d'*Oenococcus oeni*

A partir de la collection de 282 souches, les résultats ont pu être analysés seulement pour 241 souches. Ces 241 souches présentaient un comportement bien différent pour l'ensemble des milieux testés. Des rapports de croissance ont été mesurés, qui correspondent à un rapport entre la biomasse formée en milieu stress sur la biomasse formée en milieu standard (pH 4,8 et 0% EtOH). Ils varient entre 0% et 348%, selon les milieux. La moyenne des rapports de croissance, les minimums et maximums sont présentés dans le tableau 9. Pour analyser plus précisément le comportement global d'*O. oeni* dans les milieux testés, et pour comparer l'effet des milieux, des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés. Ils ont permis la

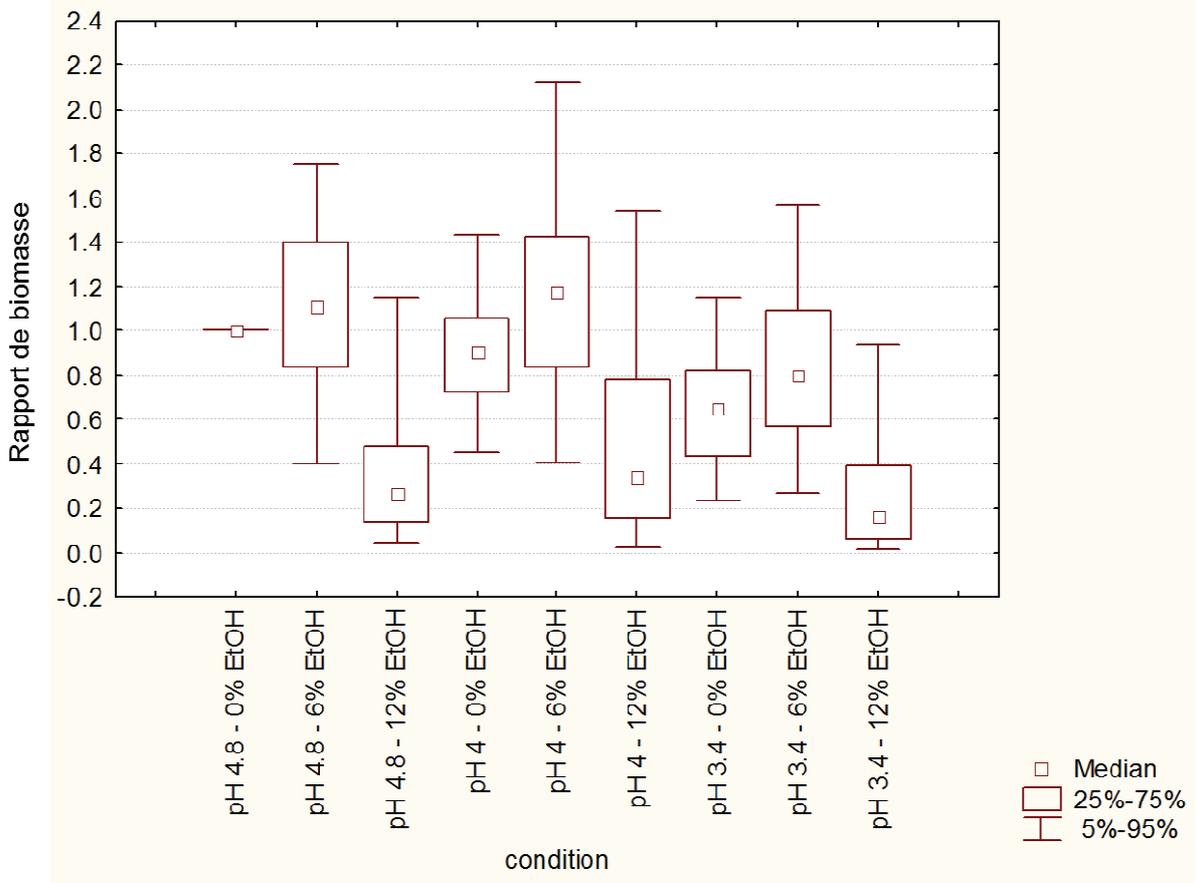


Figure 21: Box plots des rapports de biomasses pour chaque milieu. Les box plots présentent les valeurs à 25% au dessus et au dessous de la valeur médiane, les moustaches montrent les valeurs à 45% au dessus et au dessous de la valeur médiane.

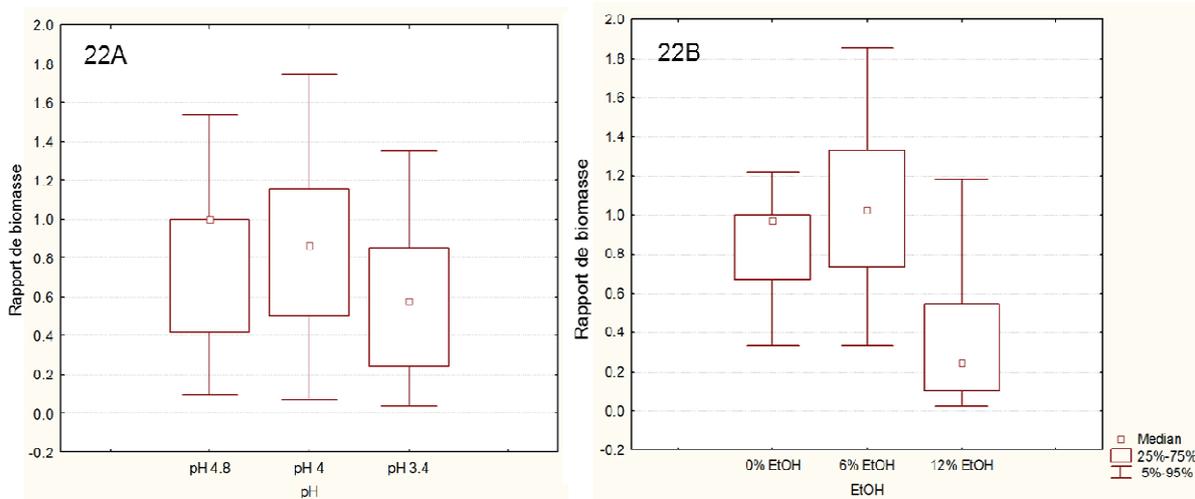


Figure 22: Box plots des ratios de biomasse, en fonction de l'acidité du milieu (22A) et de la concentration en pH (22B).

discrimination des populations génotypiques, géographiques et des populations associées aux matrices.

Les souches se sont bien multipliées dans les milieux à pH 4,8-0% d'éthanol, pH 4,8-6% d'éthanol, et à pH 4-6% d'éthanol. A tous les pH, on remarque l'effet positif de la concentration de 6% d'éthanol (figure 21). Cela confirme à une grande échelle les observations déjà relevées dans la littérature, pour quelques souches (Guerzoni et al., 1995). Par contre, naturellement, à 12% d'éthanol, on retrouve l'effet inhibiteur bien connu de l'éthanol, avec des rapports de croissance qui présentent une moyenne de 40%. Dans les deux milieux à pH 3,4, l'acidité ralentit fortement la croissance, qui est logiquement encore plus difficile à 12% d'éthanol. Pour mettre spécifiquement en évidence l'effet du pH sur la croissance, nous avons regroupé toutes les valeurs de rapport de croissance dans les milieux à pH 4,8, pH4 et pH 3,4, en formant trois groupes dont les moyennes et distributions ont été statistiquement comparées. Les moyennes n'étaient pas statistiquement différentes entre les milieux à pH 4,8 et pH4, mais était plus faible à pH 3,4 (figure 22A). La même méthode a été suivie, en s'affranchissant cette fois des valeurs de pH pour comparer l'effet des concentrations en éthanol. Comme attendu, les souches poussent mieux à 6% d'éthanol qu'à 0% d'éthanol (figure 22B). D'un autre côté, la croissance des souches est fortement affectée à 12% d'éthanol. Cette condition sélectionne très bien les souches avec un bon potentiel de croissance.

2.2.3. Analyse des résultats selon les quantités de biomasse formée

L'étude des rapports de biomasse des souches dans les différents milieux, bien que donnant des résultats intéressants, comporte un biais. En effet, pour certaines souches, les rapports de croissance calculés en prenant comme base le milieu témoin peuvent être élevés, parfois supérieurs à 1, bien que la biomasse formée soit faible. Pour la souche VO, les

	moyenne	écart type	valeur minimale	valeur maximale
pH 4.8 0%EtOH	0,94	0,53	0,16	3,89
pH 4.8 6%EtOH	1,00	0,54	0,08	2,68
pH 4.8 12%EtOH	0,31	0,26	0,01	1,23
pH 4 0%EtOH	0,81	0,44	0,13	4,02
pH 4 6%EtOH	0,98	0,40	0,13	2,41
pH 4 12%EtOH	0,38	0,30	0,00	1,36
pH 3.4 0%EtOH	0,59	0,41	0,03	4,03
pH 3.4 6%EtOH	0,70	0,32	0,00	1,69
pH 3.4 12%EtOH	0,20	0,17	0,00	0,70

Tableau 10 : Valeurs des biomasses totales formées, à partir du calcul de l'aire sous les courbes de croissance, dans chaque milieu de culture. Les valeurs sont en unités de DO. Les moyennes, écart types, valeur minimale et maximale ont été calculées

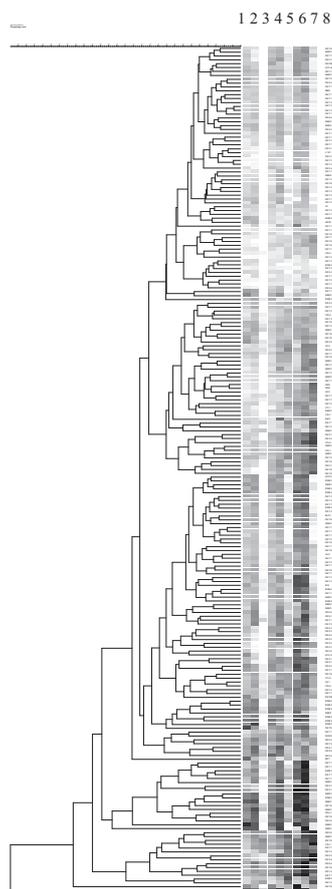


Figure 23 : Dendrogramme de phenotype de biomasse totale, classant les 241 souches. Les valeurs de biomasse formée sont codés en dégradé, allant de : blanc: valeur de biomasse formée la plus faible dans le milieu testé, à noir, valeur de biomasse la plus forte dans le milieu testé.

1: pH 4,8 0%EtOH; 2:pH4-0%EtOH; 3: pH3,4-0%EtOH; 4:pH4,8-6%EtOH; 5:pH4-6%EtOH; 6:pH3,4-6%EtOH; 7:pH4,8-12%EtOH, 8: pH4-12%EtOH; 9: pH3,4-12%EtOH

rappports sont très faibles, quel que soit le milieu. Pourtant, la croissance totale a été meilleure que celles de nombreuses souches. C'est pourquoi les analyses statistiques ont été reprises en utilisant comme valeur l'aire délimitée par la courbe de croissance des souches dans chacun des milieux. Elle représente la biomasse totale formée, et non la concentration.

Cette méthode de calcul montre également une forte distance entre les souches. Par exemple, pour le milieu pH 4,8-0% Ethanol, des biomasses de l'ordre de 0,2 unités, et à l'opposé des souches arrivant à des valeurs de biomasse de 3,9 unités ont été vues. Pour la majorité des souches, les biomasses varient entre 0,5 et 2 dans les milieux les moins difficiles, et sont inférieures à 1 dans les plus difficiles (tableau 10). Un dendrogramme a été construit à partir des valeurs de biomasse formée dans chaque milieu pour chacune des souches (figure 23), et des branches apparaissent distinctement. Pour chaque souche, la biomasse totale formée a été ramenée à un dégradé de couleur, allant du blanc, pour les croissances les plus faibles au noir pour les plus élevées.

Cinq grandes branches apparaissent, allant des souches les moins performantes dans l'ensemble des milieux, en haut du dendrogramme, jusqu'aux souches les plus performantes dans les deux branches du bas. Cette méthode, comme celle basée sur le rapport de croissance, permet de grouper les souches en fonction de leur phénotype. Les meilleures souches se détachent bien des autres. La cinquième branche regroupe ainsi les souches les plus performantes, et globalement présentant un meilleur comportement phénotypique que l'ensemble des autres souches, et une multiplication importante, même dans les milieux les plus difficiles.

Le fait d'utiliser les deux méthodes de phénotypage (calcul du rapport de croissance, et mesure de la biomasse totale formée) est intéressant. Chacune possède ses avantages et ses inconvénients, mais l'association de ces deux méthodes et le croisement des résultats permet la sélection des souches les plus performantes. Les souches qui étaient les plus performantes

expérience ratios de biomasse	expérience biomasse totale formée
DIV 2.1	DIV 2.5
DIV 5.70	DIV 2.6
DIV 6.39	DIV 5.60
DIV 7.11	DIV 6.4
DIV 7.62	DIV 6.25
DIV 7.64	DIV 7.62
DIV 7.72	DIV 7.64
DIV 7.160	DIV 7.66
DIV 7.187	DIV 7.160
DIV 7A.6	DIV 7.183
DIV 10.2	DIV 7A.7
DIV 10.9	DIV 7A.16
SABO 41	DIV 7A.20
GR6	SABO 55
IOEB 89024	IOEB 9902
SARCO-IOEB 384	V15-1
V9-2	
V10-3	
V13-3	
V15-1	

Tableau 11 : Liste des souches les plus performantes des expériences de phénotypage sur les ratios de biomasse, et les biomasses totales. Les souches révélées par les deux expériences ont été

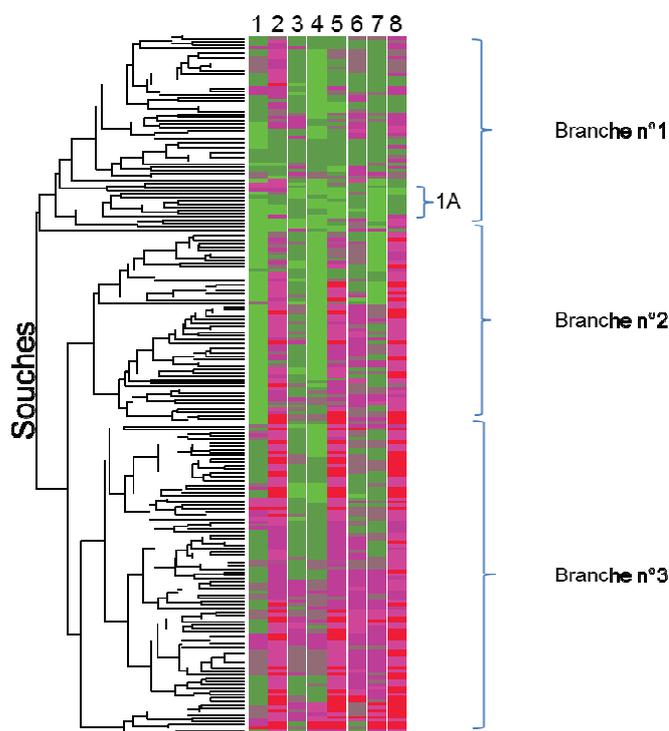


Figure 24: Dendrogramme de phénotypage de ratio de biomasse, classant les 241 souches. Les rapports de biomasses sont codés en couleur: 0-0,1(rouge); 0,1-0,3 (violet); 0,3-0,6 (rose); 0,6-1(vert fluo); >1 (vert foncé). Chaque colonne correspond au rapport de biomasse dans un milieu, par rapport à la biomasse formée dans le milieu standard (pH 4,8-0%EtOH). 1: pH 4,8 0%EtOH; 2:pH4,8-6%EtOH; 3: pH4,8-12%EtOH; 4:pH4-0%EtOH; 5:pH4-6%EtOH; 6:pH4-12%EtOH; 7:pH3,4-0%EtOH, 8: pH3,4-6%EtOH; 9: pH3,4-12%EtOH

dans chacune des deux méthodes ont ainsi été réunies (tableau 11). cela montre que ce ne sont pas les mêmes souches qui sont les mieux classées pour les deux méthodes, signe que la croissance en fonction d'un milieu de référence, et la biomasse brute formée sont deux aptitudes distinctes chez *O. oeni*. Seules quatre souches ont été classées dans les deux tests, sur les 282 souches au départ, signe que si la diversité de phénotypes est très importante, peu de souches sont vraiment capables de combiner résistance au stress et bonne croissance. Ces quatre souches sont DIV 7.62, DIV 7.64, DIV 7.160 et V15-1, à savoir deux souches appartenant au groupe phylogénétique A, et deux du groupe phylogénétique B. Une souche appartenant au groupe phylogénétique A1b se retrouve parmi les quatre. De plus même si dans l'ensemble, les souches du groupe phylogénétique A semblent globalement meilleures, certaines souches du groupe B sont au niveau des meilleures souches du groupe A et de certains levains, en performance œnologique.

2.2.4. Classification des souches dans un dendrogramme

Pour chaque souche, un phénotype « croissance » a été défini pour les rapports de croissance dans les 8 milieux différents calculés par rapport au milieu standard. Les valeurs sont groupées en : rapport statistiquement supérieur à 1, rapport non significativement différent de 1, rapport variant entre 0,6 et 1, rapport variant entre 0,3 et 0,6, rapport variant entre 0,1 et 0,3, et enfin rapport inférieur à 0,1. Ainsi, chaque souche est caractérisée par un profil correspondant à ses capacités de croissance dans chacun des milieux. Ces profils ont été utilisés à la construction d'un arbre, avec les 223 profils différents obtenus pour les 241 souches testées. La figure 24 visualise par la couleur verte de façon nette dans les colonnes 1, 4 et 7 le rôle plutôt favorable de 6% d'éthanol sur la croissance d'un grand nombre de souches. A l'inverse, les colonnes 2, 5, 8 où la couleur rouge domine montre les difficultés pour beaucoup de s'adapter à 12% d'éthanol. Par ailleurs, le dendrogramme créé révèle trois

branches majeures et une quatrième, contenant seulement trois souches ayant des profils atypiques (figure 24).

La branche n°1 du dendrogramme réunit des souches qui comptaient une bonne croissance dans presque toutes les conditions. Cette branche est divisée en quatre sous-branches. En particulier, un groupe de 10 souches se détache (1A), n'ayant que des rapports supérieurs ou égaux à 1, signe d'une croissance excellente quel que soit le milieu utilisé. Ce groupe pourrait être intéressant dans la sélection de levains malolactiques. De façon très intéressante, ce groupe de souches se trouve être composé à moitié de souches du groupe A1b.

La branche n°2 du dendrogramme est composée de souches qui se multiplient mieux dans le milieu à la concentration la plus faible en éthanol, et les pH les moins acides. De façon très logique, ces souches ont du mal à croître dans les milieux les plus difficiles.

La branche n°3 du dendrogramme comprend les souches dont la croissance est médiocre, voire mauvaise, quel que soit le milieu utilisé, tout de même moins affectée dans le milieu à pH 4 et 6% d'éthanol. Un groupe de souches se démarque, avec des croissances affectées à pH 4.8 et des croissances meilleures à pH plus faibles. Ce groupe de 7 souches est composé essentiellement de souches isolées de cidre. Les souches composant les trois branches ont été répertoriées dans l'index.

Finalement, trois souches (DIV 6.2, DIV 6.5, VO) sont éloignées par rapport aux autres souches, quel que soit le milieu testé, avec des rapports de biomasses très faibles. Elles n'ont pas été reportées dans le dendrogramme. Une des trois souches (VO) est un levain malolactique. Elle se multiplie en réalité très vite dans le milieu témoin (pH 4.8 et 0% éthanol), de sorte que la valeur du rapport des biomasses dans les autres conditions est très faible. En réalité, la biomasse totale formée, même si les rapports au milieu contrôle sont faibles, est supérieure à celles produite par les autres souches.

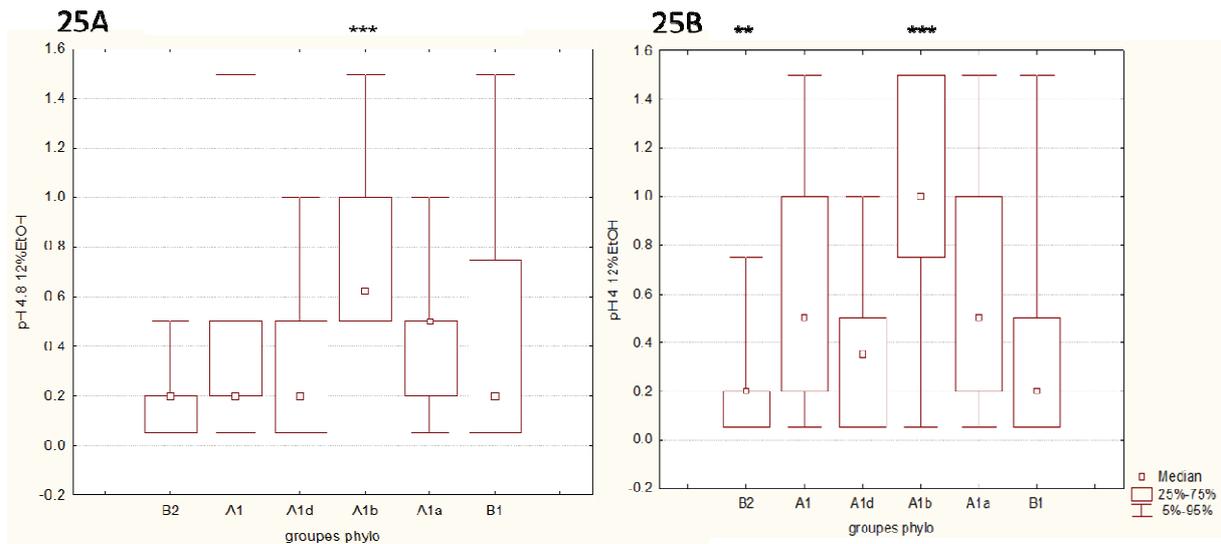


Figure 25 : Box plots de comparaison des rapports de biomasse en fonction des groupes phylogénétiques.

25A: rapports de biomasse dans le milieu pH 4,8 12%EtOH

25B: rapports de biomasse dans le milieu pH 4-12%EtOH

** : différence significative (p-value<0.05) inférieure à la moyenne

*** : différence significative (p-value<0.05) supérieure à la moyenne

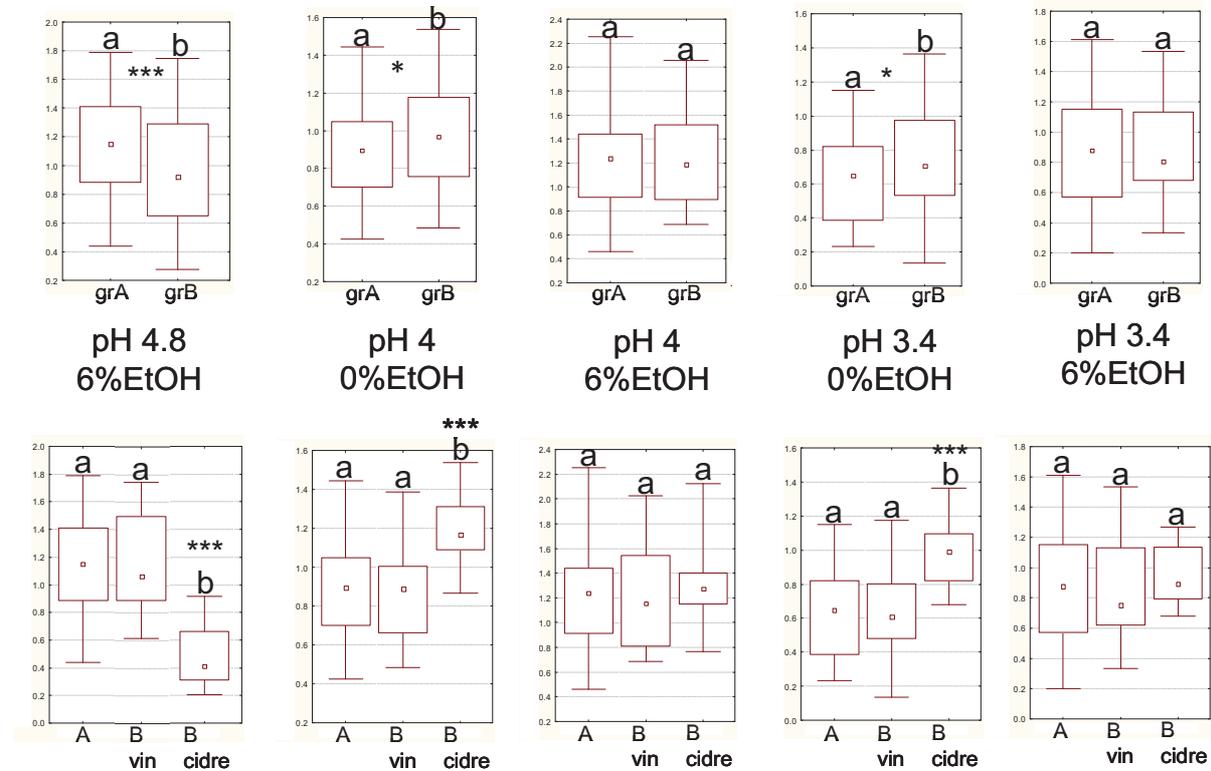


Figure 26 : Box plots de comparaison des rapports de biomasse en fonction des groupes phylogénétiques, dans les milieux à 0% éthanol et 6% d'éthanol. Les astérisques montrent une différence statistique avec *: pvalue<0.05; ***:pvalue<0.001. Les résultats des milieux avec 0% et 6% d'éthanol ont été présentés

2.2.5. Relation entre les phénotypes et les groupes phylogénétiques

L'objectif est de savoir si les groupes phylogénétiques formés par MLST coïncident ou non avec des groupes construits sur la capacité des souches à se multiplier dans les milieux testés. Pour cette étude, 6 groupes phylogénétiques ont été retenus, avec des échantillonnages assez importants. Pour cela, les souches de groupes phylogénétiques A1c, A2 et A3 ont été retirés de l'analyse (moins de 12 souches par groupe).

Par ailleurs, les rapports de biomasse formée sont statistiquement plus faibles pour les souches du groupe B, à pH 4,8-6% d'éthanol, pH 4,8-12% d'éthanol (figure 25A), et pH 4-12% d'éthanol (figure 25B). Ces souches ont globalement des difficultés de croissance dans tous les milieux, même dans les milieux les moins difficiles. Les souches du groupe A1b se multiplient mieux dans la majorité des milieux testés, et en particulier dans les conditions pH 4,8-12% d'éthanol, pH 4-12% d'éthanol, et les trois conditions à pH 3,4. Elles paraissent être les mieux adaptées aux conditions les plus difficiles d'acidité et de titre alcoométrique.

2.2.6. Comparaison des phénotypes de croissance des souches des groupes phylogénétiques A et B

Les deux populations, correspondant aux souches du groupe A et du groupe B ; ont été comparées pour leurs capacités de croissance (figures 26 et 27). Les phénotypes sont statistiquement différents pour A et B dans six conditions sur les huit testés, notamment pour les trois milieux à 12% d'éthanol. Cela suggère une corrélation entre les caractéristiques physiologiques des souches et leur génotype phénotype et le génotype (tableau 12). Comme des souches de cidre ont des comportements atypiques, les souches du groupe B ont été divisées en deux populations, un comprenant les souches isolées de cidre d'un côté, et le reste des souches du groupe B de l'autre. Une analyse statistique des rapports de biomasse des populations a montré une différence dans six conditions sur les huit (toutes sauf pH 4-6%

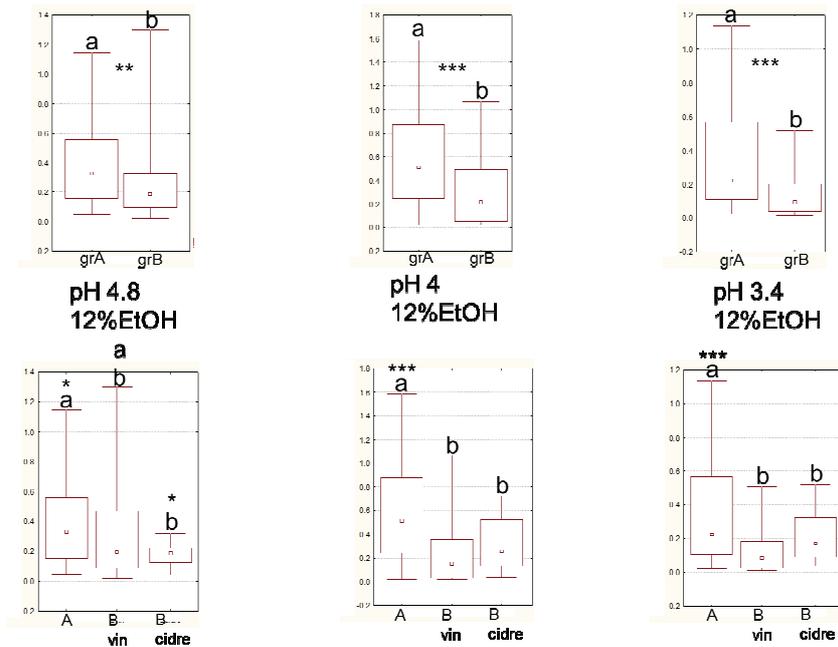


Figure 27 : Box plots de comparaison des ratios de biomasse en fonction des groupes phylogénétiques, dans les milieux de croissance à 12% d'éthanol. Les astérisques montrent une différence statistique avec *: pvalue<0.05; ***: pvalue<0.001. Les résultats des trois milieux avec 12% d'éthanol ont été présentés

Page 101

	pH 4,8 6%EtOH	pH 4,8 12%EtOH	pH 4 0%EtOH	pH 4 6%EtOH	pH 4 12%EtOH	pH 3,4 0%EtOH	pH 3,4 6%EtOH	pH 3,4 12%EtOH
A et B	Diff	Diff	Diff	0	Diff	Diff	0	Diff
A et Bvin	0	Diff	0	0	Diff	0	0	Diff
A et Bcidre	Diff	Diff	Diff	0	0	Diff	0	0
Bvin et Bcidre	Diff	0	Diff	0	0	Diff	0	0

Tableau 12 : Tableau des différences statistiques des rapports de biomasse des souches des groupes phylogénétiques A, B, et des souches du groupe B divisées entre celles isolée de cidre et de vin), dans chaque milieu testé. Les différences statistiques trouvées entre deux populations sont annotées Diff (p-value<0,05). Le 0 représente une absence de différence statistique.

d'éthanol, et pH 3,4-6% d'éthanol). Dans ces milieux, les moins difficiles, la différence de phénotype initialement observée entre souches du groupe A et B apparaît inexacte. En réalité, seules les souches de cidre ont des rapports de biomasse plus faibles que les souches issues de vins (figure 26). Cependant, dans les milieux les plus difficiles (à 12% d'éthanol), les souches du groupe A ont des rapports de biomasse bien supérieurs à ceux des souches de cidre et les autres souches du groupe B (qui ont des biomasses similaires (figure 27)). Nous avons ainsi démontré que les souches du groupe A avaient en moyenne un meilleur comportement de croissance dans les milieux à 12% d'éthanol, que les souches du groupe B, à des conditions qui se rapprochent le plus des conditions viticoles.

2.2.7. Relation entre le phénotype et l'origine géographique

L'influence de la région de production des vins sur le phénotype des souches a été recherchée, par la même méthode, en formant des groupes dont les rapports de croissance ont pu être statistiquement comparés. Au total 200 souches ont été analysées, réparties dans neuf groupes distincts (Afrique du sud, Allemagne, Aquitaine, Bourgogne, Champagne, Italie, Espagne, Normandie et Chili). Les 41 souches restantes n'ont pas été retenues car elles provenaient de régions où l'échantillonnage n'était pas assez grand. Très peu de différences significatives ont ainsi été observées entre les populations géographiques. La seule concerne les souches provenant de cidre de Normandie dans la condition de pH 4,8-6% d'éthanol, avec des rapports de croissance plus faibles. D'un autre côté, des souches du Chili se multiplient mieux dans les milieux à 12% d'éthanol, mais la différence n'est pas significative. Ce résultat correspond au meilleur comportement de croissance des souches du groupe phylogénétique A1b, composé en majorité de souches provenant du Chili.

2.2.8. Relation entre le phénotype et le type de produit

D'un autre côté, les souches ont été groupées en fonction du type de produit dont elles avaient été isolées. Cinq groupes ont été constitués et comparés : vin rouge, vin blanc, cidre, champagne et fruits à noyaux. Les souches de cidre se distinguent des autres dans plusieurs conditions, faisant de la population cidricole, une population particulière, avec un phénotype propre. En effet, les souches de cidre poussent curieusement moins bien que les autres dans un milieu généralement considéré plus facile, à pH 4,8-6% d'éthanol. De plus, elles se multiplient mieux que les autres dans des milieux sans éthanol, à pH 4 ou 3,4. Un autre résultat intéressant est le comportement des souches de vin rouge globalement. Dans les milieux les plus difficiles, ces souches présentent des ratios de croissance supérieurs aux autres, même si cette différence n'est pas statistiquement vérifiée. Il est également à noter que le pH ne favorise pas les souches venant de champagne, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre.

2.3. Etude de la fermentation des sucres

Les sucres sont des composés largement utilisés par les microorganismes pour leur croissance, à des fins de synthèse de composants cellulaires et d'énergie. Chez *O. oeni*, ils sont métabolisés par la voie hétérofermentaire, qui outre de l'ATP, utilisé par la cellule, libère du D-lactate, de l'acétate et de l'éthanol comme produits principaux (figure 1). Les hexoses, pentoses et divers autres sucres composés ou des molécules glycosylées sont utilisées par *O. oeni* dans le vin.

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité des souches de la collection à fermenter quelques. Les neuf sucres retenus sont le glucose, le fructose, le maltose, le ribose, le galactose, l'arabinose, le mannose, le saccharose et le xylose. La majorité des sucres présents dans le vin se trouvent être le glucose et le fructose, mais les autres sucres sont présents aussi en quantité variable, à l'exception du saccharose.

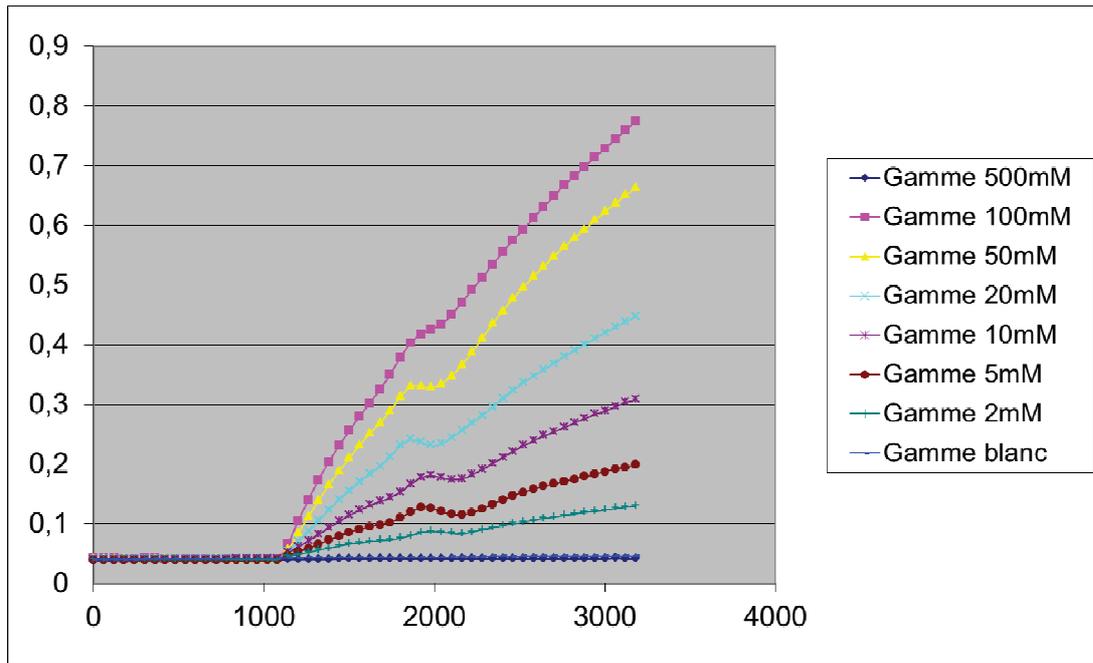


Figure 29 : Courbes des réactions enzymatiques de formation de NADH en fonction du temps, par la dégradation de D-lactate. Les concentrations initiales en D-lactate dans le mélange réactionnel ont été indiquées.

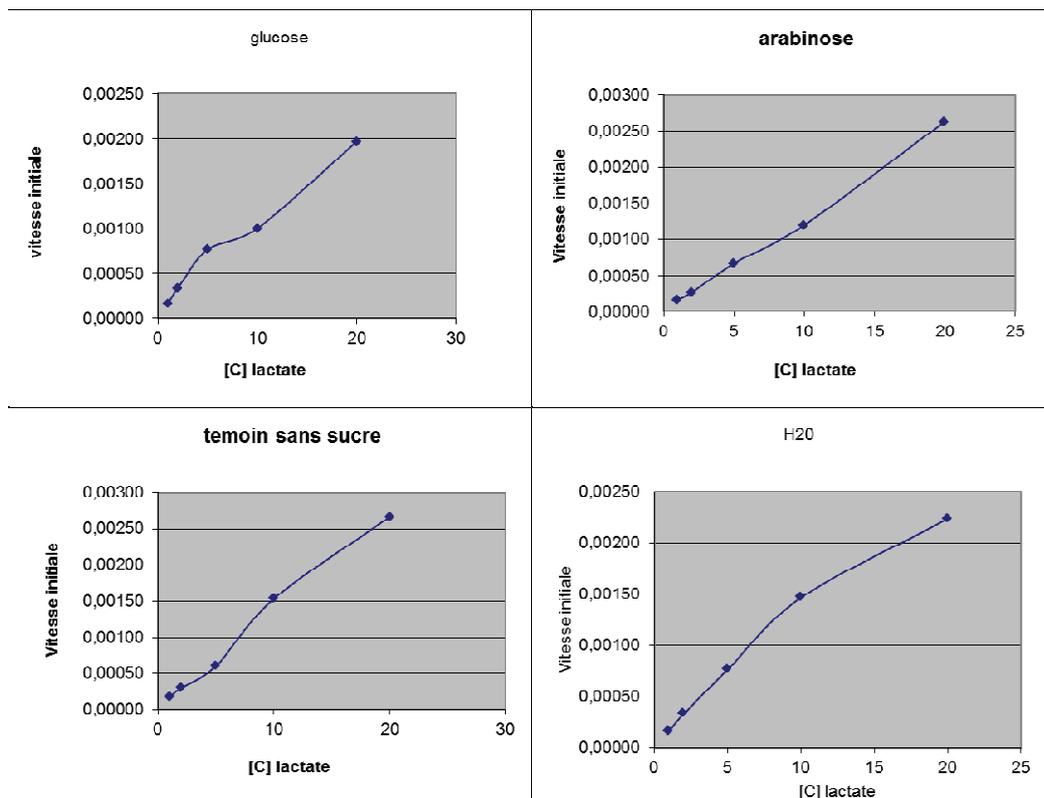


Figure 30 : Courbe de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en D-lactate. Le dosage a été réalisé dans trois milieux minimums, supplémentés soit de glucose et arabinose à 5g/l, soit non supplémenté, et dans de l'eau.

2.3.1. Tests préliminaires

Par définition, le principal produit du métabolisme fermentaire d'*O. oeni* est l'acide D-lactique, quel que soit le sucre fermenté. C'est donc sa production qui a été suivie pour établir la capacité ou non de chacune des souches à fermenter les neuf sucres choisis.

Après incubation pendant deux semaines, l'acide lactique est dosé dans chaque culture par voie enzymatique, le NADH produit dans la réaction faisant l'objet de la mesure. Pour adapter au protocole du haut débit, la détection colorimétrique est réalisée comme indiquée dans le matériel et méthodes. Le dosage se fait en point final, une fois que tout le lactate a été oxydé et donc tout le NADH formé.

Dans la mise au point de l'analyse en haut débit, un test préliminaire a été effectué, dans des milieux où la concentration dans le milieu a été ajustée à 2mM, 5mM, 10mM, 20mM, 50mM, 100mM et 500mM de D-lactate. Une fois le mélange réactionnel complet, l'évolution de la DO à 570nm a été suivie. Contrairement aux conditions habituelles du dosage, la réaction ne se pas dans les 20-25 minutes. Mais la pente des courbes est proportionnelle à la quantité de D-lactate dans le milieu. C'est donc la vitesse initiale de la réaction qui sera utilisée pour calculer la concentration en D-lactate du milieu. Si la concentration en sucres fermentés est de l'ordre de 5g/l, et donc de 27mM, ce sont 27 mM de D-lactate qui sont formés. Cette valeur est dans la zone de linéarité du dosage selon le protocole (figure 29).

L'influence du milieu sur l'efficacité de la réaction a également été mesurée. Pour cela la vitesse de la réaction de dégradation a été mesurée en présence de 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 20mM de D-lactate, dans le milieu de culture supplémenté soit de 5g/l de glucose, 5g/l d'arabinose, 5g/l de mannose, soit un milieu non supplémenté. Un contrôle a également été réalisé en remplaçant le milieu par de l'eau. Les résultats montrent des courbes de vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en D-lactate parfaitement corrélées,

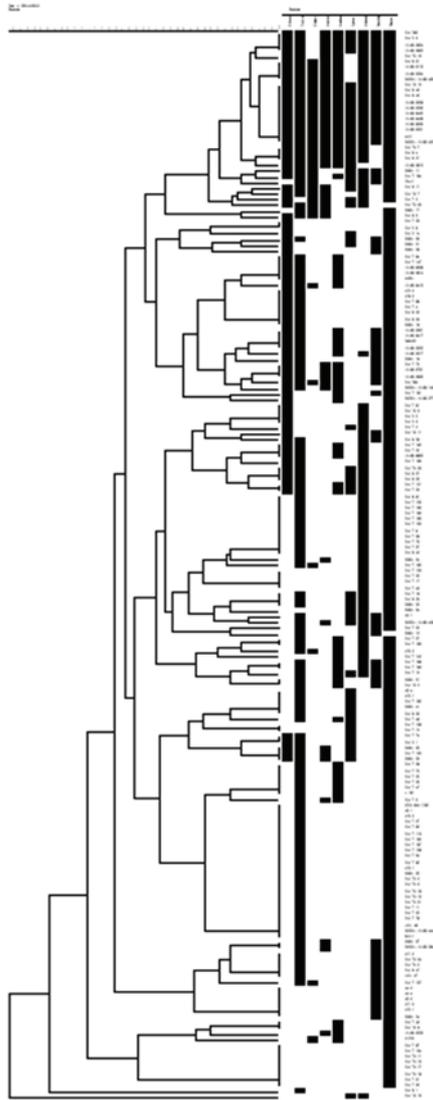


Figure 31 : Dendrogramme de la dégradation de sucres par les 214 souches de la collection. Les carrés noirs correspondent à la dégradation du sucre par la souche, et les carrés blancs indiquent leur non dégradation. Chaque colonne correspond à un sucre:
 1: glucose; 2: fructose; 3: galactose; 4: maltose; 5: arabinose; 6:mannose; 7:xylose; 8: saccharose; 9 ribose

similaires quel que soit le milieu utilisé (figure 30). De plus les valeurs de vitesse initiale de réaction dans les différents milieux, à concentration égale en D-lactate, sont également similaires.

Il a donc été montré que la réaction visant à doser la concentration en acide D-lactique était bien linéaire, les résultats étaient bien proportionnels à la concentration en D-lactate dans le milieu. Les milieux utilisés n'influaient également pas sur les résultats. L'étude a donc été poursuivie.

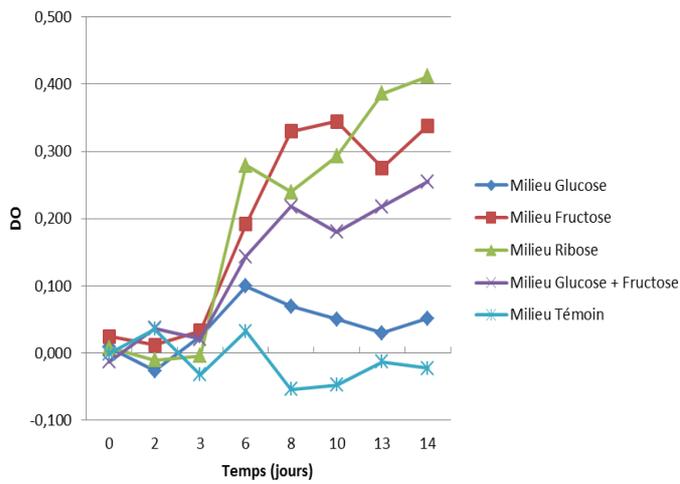
2.3.2. Capacité des souches de la collection à fermenter les 9 sucres

L'expérience principale a été réalisée avec les 282 souches de la collection, inoculées dans un milieu minimum supplémenté de 5g/l de chacun des sucres, puis incubées pendant deux semaines à 25°C. A la fin de cette culture, les dosages de D-lactate ont été effectués. Des problèmes de répétabilité ont été rencontrés lors de cette expérience, avec des triplicats donnant des valeurs différentes. Par conséquent, seules les cultures où deux réplicats sur trois concordaient ont été retenues comme positifs. Cette méthode permet de limiter les risques dus aux faux positifs, mais d'un autre côté, il est très probable que de nombreux faux négatifs soient ignorés. Finalement, les résultats sur seulement 203 souches des 282 du départ ont pu être comparées et analysées. Le protocole n'est donc pas parfaitement au point mais déjà un très grand nombre de souches peuvent être comparées sur 9 sucres différents.

Le premier constat est que les sucres majoritairement dégradés par le plus grand nombre de souches sont le ribose, avec 97% des souches capables de dégrader ce sucre, et le fructose par 70% des souches. Les autres sucres sont dégradés selon les cas par 14 à 34% des souches. Il existe donc une grande diversité. De façon surprenante, seulement 34% des souches fermentent le glucose dans ces conditions. De plus 30% de souches sont incapables de dégrader le fructose. Ces phénotypes, bien que surprenants, ont déjà été observés chez des

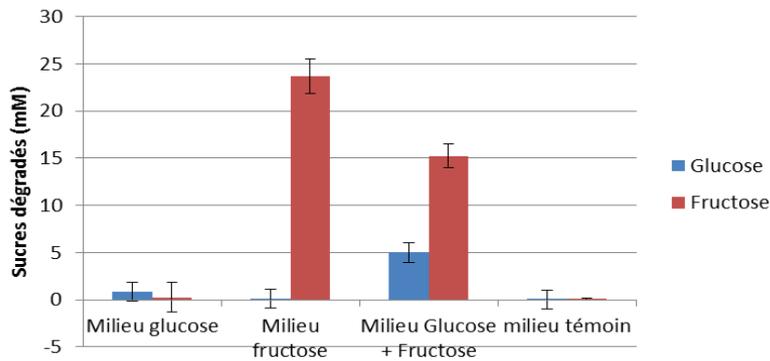
32A

Croissance de la souche DIV 6.1



32B

Dégradation des sucres par DIV 6.1



32C

Produits formés par la souche DIV 6.1

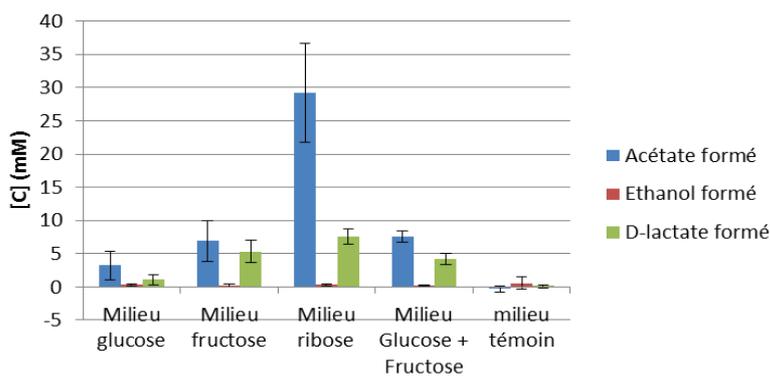


Figure 32 : Phénotype de la souche DIV 6.1 en réponse à l'inoculation dans cinq milieux: milieu minimum avec ajout de 5g/l de glucose, de 5g/l de fructose, de 2.5g/l de glucose et fructose, de 5g/l de ribose, et milieu témoin sans ajout de sucre.

32A : croissance de la souche, mesurée par densité optique.

32B: capacité de dégradation de sucres par la souche DIV 6.1. La capacité à dégrader le glucose et le fructose a été mesurée, en g/l consommés

32C : formation des produits de la voie hétérofermentaire (éthanol, acétate, D-lactate), mesurée en mM formés.

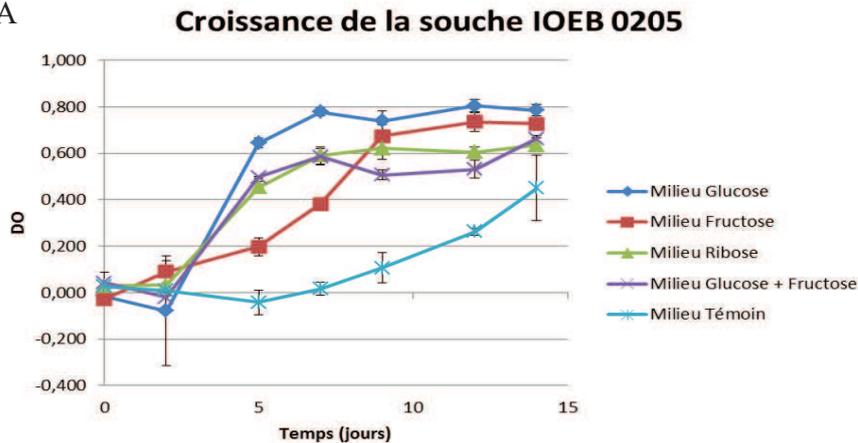
souches isolées de vins italiens (Vigentini et al., 2009). Pour analyser les résultats, un arbre a été construit (figure 31). Au total, 52 profils d'utilisation des sucres différents ont été obtenus pour les 203 souches analysées. Dix souches fermentent tous les sucres testés.

Le résultat principal de cette étude, outre la variabilité au sein de la collection, est l'incapacité d'un nombre important de souches à métaboliser le glucose et le fructose. Ce résultat étonnant est en contradiction avec ce qui est généralement connu ou supposé du métabolisme d'*O. oeni*. C'est pourquoi des expériences complémentaires ont été effectuées pour savoir si ces résultats étaient réels ou bien provoqués par un biais de l'expérience. Dans les conditions où elle a été réalisée.

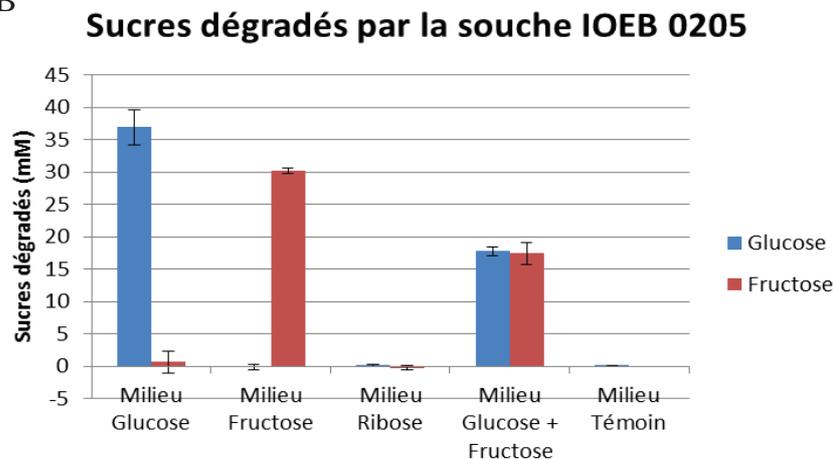
2.3.3. Capacité de fermentation du glucose et du fructose

Dans l'expérience « haut débit », et dans ces conditions précises, plus de 50% des souches ne sont pas capables de fermenter le glucose, de même pour 30% qui ne fermentent pas le fructose. Une hypothèse était que le volume très faible de culture, et la réalisation de l'expérience à grande échelle, pouvait avoir entraîné des biais, et faussé les résultats. C'est pour cela qu'une expérience complémentaire a été conduite avec trois souches. Pour cela, les cultures ont été réalisées dans les mêmes milieux, dans des volumes de 10ml, et sur un nombre restreint de souches. Trois souches, au total ont été retenues : DIV 6.1 a été sélectionnée, pour sa capacité selon le résultat précédent à métaboliser le fructose, mais pas le glucose, DIV 2.2, qui fermente le glucose et non le fructose, et IOEB 0205 qui dégrade les deux sucres. Par ailleurs, comme toutes les souches fermentent le ribose dans les conditions « haut débit », ce sucre a été inclus dans l'expérience de vérification. Les trois souches ont été cultivées dans le milieu minimum, supplémenté soit de 5g/l (28mM) de glucose (G), soit 5g/l de fructose (F), soit d'un mélange de 2,5g/l de G+F, soit de ribose à 5g/l (33mM). Au fur et à mesure de la croissance, la concentration cellulaire a été mesurée par étalement sur boîtes et densité optique, et des prélèvements de culture ont été effectués, à des intervalles de temps

33A



33B



33C

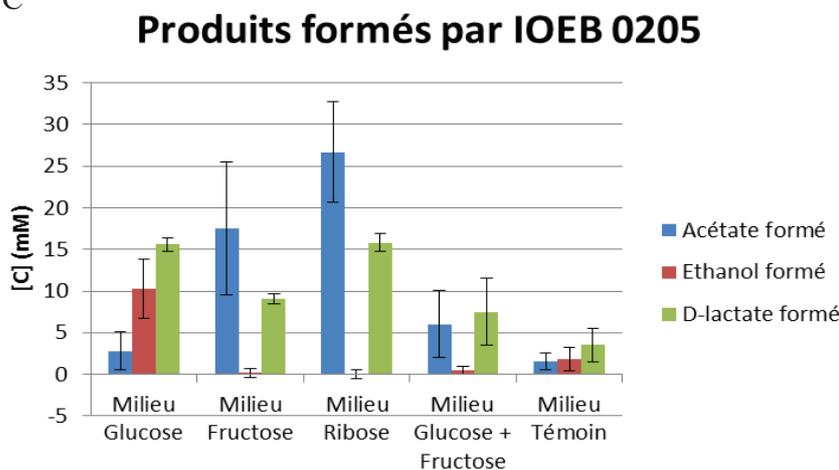


Figure 33 : Phénotype de la souche IOEB 0205 en réponse à l'inoculation dans cinq milieux: milieu minimum avec ajout de 5g/l de glucose, de 5g/l de fructose, de 2.5g/l de glucose et fructose, de 5g/l de ribose, et milieu témoin sans ajout de sucre.

33A: croissance de la souche, mesurée par densité optique.

33B : capacité de dégradation de sucres. La capacité à dégrader le glucose et le fructose a été mesurée, en g/l consommés

33C : formation des produits de la voie hétérofermentaire (éthanol, acétate, D-lactate), mesurée en mM formés.

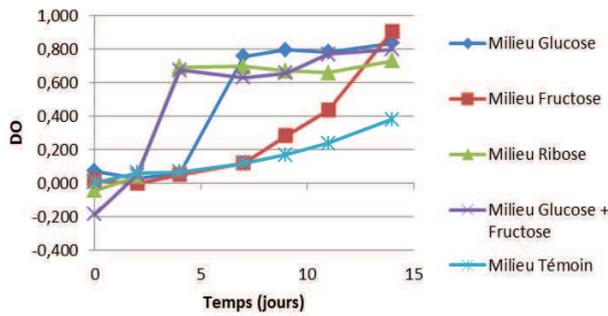
réguliers, à t₀, t_{2j}, t_{3j}, t_{6j}, t_{8j}, t_{10j}. La dégradation du glucose et du fructose a été mesurée par dosage des sucres résiduels et par la formation d'acide D-lactique, d'éthanol et d'acétate. Comme le milieu contient de l'acide L-malique, la réaction malolactique a aussi été suivie. (dosage de L-malate et L-lactate).

En premier lieu, on remarque la concordance des résultats de cet essai complémentaire avec ceux de l'analyse « haut débit ». La souche DIV 6.1 est effectivement incapable de fermenter le glucose lorsqu'il est seul présent (figure 32A). Elle se multiplie (figure 32B), et elle dégrade 23mM (82%) de fructose comme attendu. Mais par ailleurs, elle fermente tout le fructose du milieu G+F et pratiquement 50% du glucose (respectivement 15 et 7mM). Le ribose n'a pas été dosé (à cause de l'absence de méthode enzymatique), mais il est probable qu'il ait été entièrement fermenté, car la croissance a été abondante. En théorie, on attend pour une bactérie hétérofermentaire comme *O. oeni*, à partir de 33mM de ribose (si tout est fermenté), 33mM de D-lactate et autant de la somme en éthanol et acétate. Dans le milieu F et le milieu G+F, on attend respectivement 28mM et 22mM de D-lactate, et autant d'éthanol + acétate.

La figure 32C renseigne sur les concentrations des produits principaux de la fermentation à la fin de l'incubation des cultures de cette souche. Le premier constat est la très faible concentration d'éthanol. Ensuite, les concentrations mesurées de produits totaux sont formées à partir du ribose : 29mM d'acétate et 7mM de D-lactate sont accumulés. Dans les autres milieux, notamment F et G+F, où la croissance est active, ces produits sont bien moins abondants. Nous manquons certainement d'autres éléments pour interpréter ces résultats. L'un d'eux est la concentration en mannitol produit par la réduction du fructose. Cette réaction peut expliquer en grande partie la dégradation des produits dans les milieux F et G+F. L'absence d'éthanol pourrait s'expliquer par le défaut d'activité enzymatique de la voie à partir de l'acétyl-phosphate. Cela n'empêcherait pas la dégradation des sucres car les

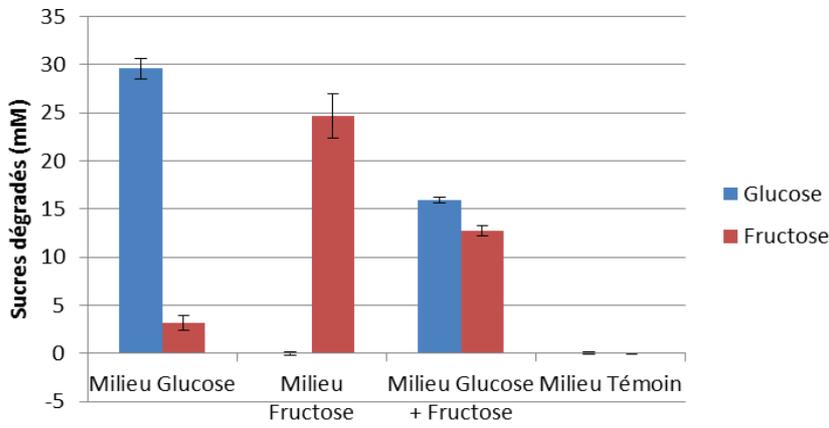
34A

Croissance de la souche DIV 2.2



34B

Dégradation des sucres par la souche DIV 2.2



34C

Produits formés par la souche DIV 2.2

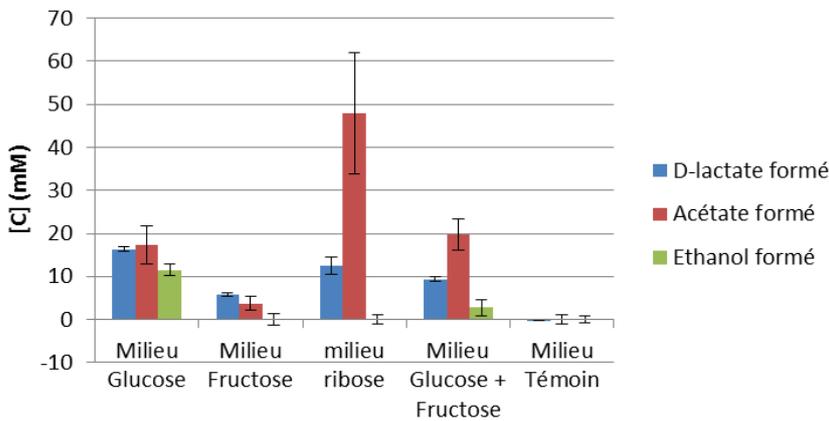


Figure 34 : Phénotype de la souche DIV 2.2 en réponse à l'inoculation dans cinq milieux: milieu minimum avec ajout de 5g/l de glucose, de 5g/l de fructose, de 2.5g/l de glucose et fructose, de 5g/l de ribose, et milieu témoin sans ajout de sucre.

34A: croissance de la souche, mesurée par densité optique.

34B : capacité de dégradation de sucres. La capacité à dégrader le glucose et le fructose a été mesurée, en g/l consommés

34C : formation des produits de la voie hétérofermentaire (éthanol, acétate, D-lactate), mesurée en mM formés.

coenzymes réduits seraient réoxydés dans la production du mannitol. Mais l'on n'explique pas le déficit en molécules d'acétate et de D-lactate.

Les résultats de fermentation des sucres de la souche IOEB 0205 sont également concordants avec ceux observés dans l'expérience « haut débit ». Celle-ci, initialement supposée fermenter le glucose et le fructose, croît de manière importante dans les milieux testés (figure 33A), et dégrade complètement les sucres du milieu (figures 33B). Il y a cependant un faible retard de croissance de la souche dans le milieu fructose. Le dosage des produits formés confirme la fermentation des sucres par la voie hétérofermentaire (figure 33C), du fait de la présence d'acide D-lactique dans toutes les cultures (entre 10 et 15mM). Encore une fois, les produits formés ne sont pas en quantité égale, ce qui présuppose un métabolisme alternatif, qui utilise ces produits et donne ainsi des résultats incohérents. Nous pouvons cependant noter encore une fois l'absence d'éthanol en fin de culture dans la plupart des expériences.

La souche DIV 2.2, retenue pour sa capacité à dégrader le glucose, et non le fructose, présente elle des résultats légèrement discordants (figure 34). Celle-ci, dans les conditions de l'expérience, présente une dégradation importante de glucose, comme prévu. Mais elle dégrade également en totalité le fructose. Toutefois, ces résultats ne sont pas en désaccord avec l'expérience « haut débit ». Premièrement, un fort retard de croissance de la souche est observé dans le milieu fructose. De plus, la fermentation de fructose s'est faite en majorité dans les 5 derniers jours d'incubation, alors qu'habituellement, les sucres sont dégradés dès les premiers jours de culture. Enfin, dans le milieu fructose, il y a eu peu d'acétate et de D-lactate formé, respectivement 4 et 6mM, au lieu des 10-15mM observés dans les autres expériences. Ceci prouve que le fructose, bien que métabolisé par la souche DIV 2.2, n'emprunte pas la voie hétérofermentaire, et qu'il est probablement dégradé en mannitol.

2.4. Discussion

2.4.1. Une grande diversité phénotypique

A la fois pour la capacité des souches à se multiplier en milieu acide et alcoolisé, et leur aptitude à fermenter divers sucres, cette étude démontre la grande diversité phénotypique chez cette espèce. Le protocole en « haut débit » était seul à nous permettre d'approcher cette question. Des souches sont bien adaptées aux milieux difficiles, d'autres pas du tout. L'analyse des résultats par la construction d'un arbre basé sur les biomasses formées dans les différentes conditions pour chacune des souches est très informative. L'arbre classe facilement les souches résistantes et les souches les plus affectées par les stress.

La capacité de fermenter tel ou tel sucre a été déterminée, et montre encore une fois une grande diversité de phénotypes. Les résultats en « haut débit » ont été plus sujets à difficulté. Toutefois, ils ont mis à jour l'incapacité de certaines souches à dégrader le glucose, ou le fructose pour d'autres. Il est possible que cette étude soit en partie biaisée par les conditions expérimentales, mais la répétition des essais et les résultats qui en découlent confirment ces propriétés. Pour quelques souches, il a bien été vérifié dans des cultures conduites classiquement que certaines ne fermenteraient pas ces sucres. Jusqu'ici, aucune étude de grande ampleur n'avait pu mettre cela en évidence. Toutefois, des souches ne sachant pas fermenter le glucose ou le fructose ont déjà été trouvées (Vigentini et al., 2009). De plus la capacité de fermentation du glucose en présence de fructose a aussi été en partie montrée. En effet certaines souches avaient la capacité de mieux se multiplier dans un milieu G+F que dans un milieu G, ou F (Zhang et Lovitt, 2005). Il n'est pas exclu que dans la constitution des collections ou dans le passé, la culture sur glucose était la base, des souches aient été éliminées.

Par ailleurs, la comparaison de souches issues de différents produits a permis de montrer que les souches issues de vins pouvaient avoir des phénotypes clairement différents des souches de cidre, et ceci curieusement dans des milieux pourtant généralement favorables

à une bonne croissance. Cette constatation même si elle était attendue, compte tenu du fait que le cidre et le vin sont des environnements différents, n'était pas obligatoirement vraie, et elle a donc été confirmée. De plus la différenciation génétique des souches de cidre permet donc de penser que les souches de cidre représentent un groupe à part, bien distinct des autres souches.

2.4.2. Influence de la constitution des populations

Un problème important dans l'analyse des données a été la pertinence des groupes délimités dans l'analyse statistique. En effet, pour plusieurs populations, l'échantillonnage était fortement biaisé. Par exemple, pour le groupe phylogénétique A1b dont la croissance était bonne, il est composé à près des deux tiers de souches issues du Chili. Le même problème a été rencontré avec les souches issues de cidre dans le groupe phylogénétique B, ou encore les souches sud-africaines dans le groupe A1c. Il a donc fallu au sein du groupe, séparer à chaque fois les souches en deux sous-groupes, et les comparer statistiquement. Cette méthode a permis de mettre en évidence deux résultats importants. D'une part, la conclusion est effectivement que les souches de cidre sont différenciées des autres du groupe B, elles doivent donc être étudiées séparément. D'autre part, c'est bien le groupe phylogénétique A1b qui est statistiquement différent des autres. Les souches ne provenant pas du Chili possèdent des phénotypes identiques aux souches chiliennes. Ce résultat est important car il montre clairement une association entre un bon phénotype de croissance et de survie, et un fond génétique particulier.

2.4.3. Place des levains malolactiques dans l'analyse

Dans cette étude, plusieurs levains commercialisés ont été analysés, et classés dans le dendrogramme. Contrairement à ce qui était attendu, ces souches ne se distinguent pas des autres par une meilleure tolérance aux milieux difficiles. Toutefois, certaines se démarquent

des autres. En particulier, VO se multiplie très bien dans le milieu contrôle de base, et sa croissance est affectée par l'acidité et l'alcool. Toutefois, la biomasse totale formée dans ces milieux restait largement supérieure à la biomasse formée par d'autres souches. Cela suggère que dans la qualité des levains, le potentiel de croissance dont dépend la formation de biomasse est tout aussi important que sa tolérance au milieu. Mais cette déduction n'est pas vérifiée pour tous les levains. En conclusion, la mesure des performances dans ces conditions a été une méthode efficace pour visualiser la diversité phénotypique de l'espèce *Oenococcus oeni*, mais elle n'est pas directement adaptée à la sélection de levains malolactiques.

2.4.4. Relation entre phylogénie et phénotype

Un des objectifs de l'étude était de savoir s'il existait globalement une relation entre génotype et phénotype dans l'espèce *O. oeni*, au travers de l'étude des différents groupes phylogénétiques et des groupes de phénotypes. De ces résultats pourrait être tirée l'hypothèse qu'un fond génétique particulier est nécessaire à un phénotype de meilleure adaptation au vin. Jusqu'ici, aucune association n'a été faite entre un type génomique, et une meilleure adaptation aux conditions œnologiques, à part la corrélation distinguée avec des marqueurs génétiques, plus ou moins isolés sur le génome (Bon et al., 2009).

La mise en évidence qu'un sous-groupe phylogénétique (le groupe A1b) rassemble des souches bien adaptées dans les milieux testés est donc un résultat intéressant. Une étude approfondie de souches de ce groupe pourraient identifier des gènes ou îlots de gènes spécifiques. Après analyses statistiques sur des collections, ils pourraient s'ajouter aux précédents et faciliter la sélection de levains malolactiques dans le futur.

De même, la séparation statistique d'une différence de phénotype entre les souches des groupes A et B est aussi prometteuse pour la suite des recherches. En effet ces deux groupes ont une réelle signification, puisque déjà délimités dans de nombreuses études génétiques, avec différentes méthodes. Le groupe A ne comporte que des souches issues de vin, alors que

les souches du groupe B proviennent à la fois de vin, mais également de cidre, de fruits à noyaux, ou de poiré. Le meilleur phénotype global des souches du groupe A par rapport aux souches du groupe B fait donc penser que les souches du groupes A sont globalement mieux adaptées aux conditions du vin. En moyenne, les souches du groupe A sont mieux adaptées à l'acidité et à l'éthanol, notamment à un pH de 3,4 et une concentration en éthanol de 12%, mais également forment plus de biomasse. Ce dernier point est crucial en œnologie, puisqu'il est communément admis que la fermentation malolactique ne débute en cuve seulement si la concentration atteint un certain seuil (de l'ordre de 10^6 c/ml). Toutefois, ce résultat n'est que statistique, et ce qui est observé est une différence moyenne de phénotype. Certaines des souches du groupe A ont des faibles performances, et le comportement de certaines souches du groupe B est voisin de celui des meilleurs souches du groupe A. Néanmoins, la probabilité de trouver une souche performante est plus importante dans le groupe phylogénétique A.

PARTIE 3 :
ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA REPOSE D'*OENOCOCCUS*
***OENI* AU STRESS VIN**

3. Etude transcriptomique de la réponse d'*Oenococcus*

***oeni* au stress vin**

La compréhension des mécanismes de résistance au stress chez *O. oeni* est un enjeu important, étant donné que l'adaptation de cette espèce au vin est primordiale dans la réussite de la FML. Plusieurs études ont démontré l'importance de certains gènes impliqués dans la résistance au stress. Cependant, aucune étude de transcriptomique à grande échelle n'a encore été faite. L'étude globale utilisant l'hybridation d'ADNc sur une « puce » d'ADN a donc été envisagée. Cette étude a été réalisée sur un panel de sept souches.

3.1. Choix préliminaires à l'étude transcriptomique

3.1.1. Choix des souches à utiliser

Quarante puces d'hybridation étaient disponibles, ce qui limitait à 7 le nombre de souches à étudier. En effet, pour chaque souche, on mesure l'expression des gènes en condition témoin, puis après le stress, et chaque essai est réalisé en triplicat. Pour une souche, l'hybridation a donc seulement été dupliquée.

Les sept souches ont été sélectionnées en fonction d'une part de leurs profils génétiques, mais également en fonction de leur croissance dans un milieu acide et alcoolisé (voir partie résultats, paragraphe 2.1). Cinq souches isolées de vin ont été retenues :

- BL01 (groupe phylogénétique A1d, isolée de champagne) et DIV 7.32 (groupe phylogénétique B2, isolée de vin rouge), capables de survivre et croître dans des milieux acides
- SABO11 (groupe A1c, issue de vin rouge), présentant des croissances et des taux de survie parmi les plus faibles
- PSU1 (groupe phylogénétique A1a et souche de référence, issue de vin rouge)

- DIV 10.7 (groupe phylogénétique A2, issue de vin blanc)

Par manque de place, il n'a pas été possible de sélectionner de souches issues du groupe phylogénétique A1b. Deux autres souches ont été choisies, car isolées de cidre, tenant compte aussi de leur comportement de croissance dans un milieu stress. Il s'agit des souches DIV 5.23 (performante en conditions de stress) et DIV 5.60 (retard de croissance), les deux appartenant au groupe phylogénétique B.

3.1.2. Choix des conditions de stress

L'objectif est de connaître la réponse au stress provoqué par l'inoculation dans du vin. La plupart des études perpétrées se sont limitées à observer la réaction à l'acidité et à l'éthanol, de quelques marqueurs. Dans cette étude globale, nous avons privilégié une expérimentation plus proche des conditions réelles en choisissant le vin comme milieu, tout en sachant que tous les vins ont des compositions différentes. Les polyphénols du vin gênent considérablement la réalisation des expériences de PCR quantitative. Il a donc été décidé de les éliminer avec du charbon actif. Il s'agit bien dans cet essai d'analyser la réponse au choc brutal à l'inoculation dans le vin, car à cette étape, les levains malolactiques industriels doivent survivre. Par ailleurs, ont été choisies des souches à croissance la plus abondante possible, pour obtenir la biomasse adéquate pour l'extraction d'ARN en quantité suffisante.

Une expérience préliminaire a été réalisée afin de fixer les conditions du stress. La durée d'incubation après l'inoculation a été fixée à 2h, 7h et 24h dans le vin décoloré. La survie des souches a été mesurée, en dénombrant les colonies pour calculer la concentration des cellules. Le rendement d'extraction des ARNs a également été testé, une quantité important étant requise pour la réalisation des « puces » transcriptomiques. Le vin rouge issu de Cabernet Sauvignon avait un pH de 3,76 et une concentration en éthanol de 13,2%. Dans cet essai préliminaire, deux souches ont été testées, SABO11 et DIV 7.32, inoculées dans le vin à une concentration de 10^6 c/ml. La survie a été mesurée par la concentration de cellules

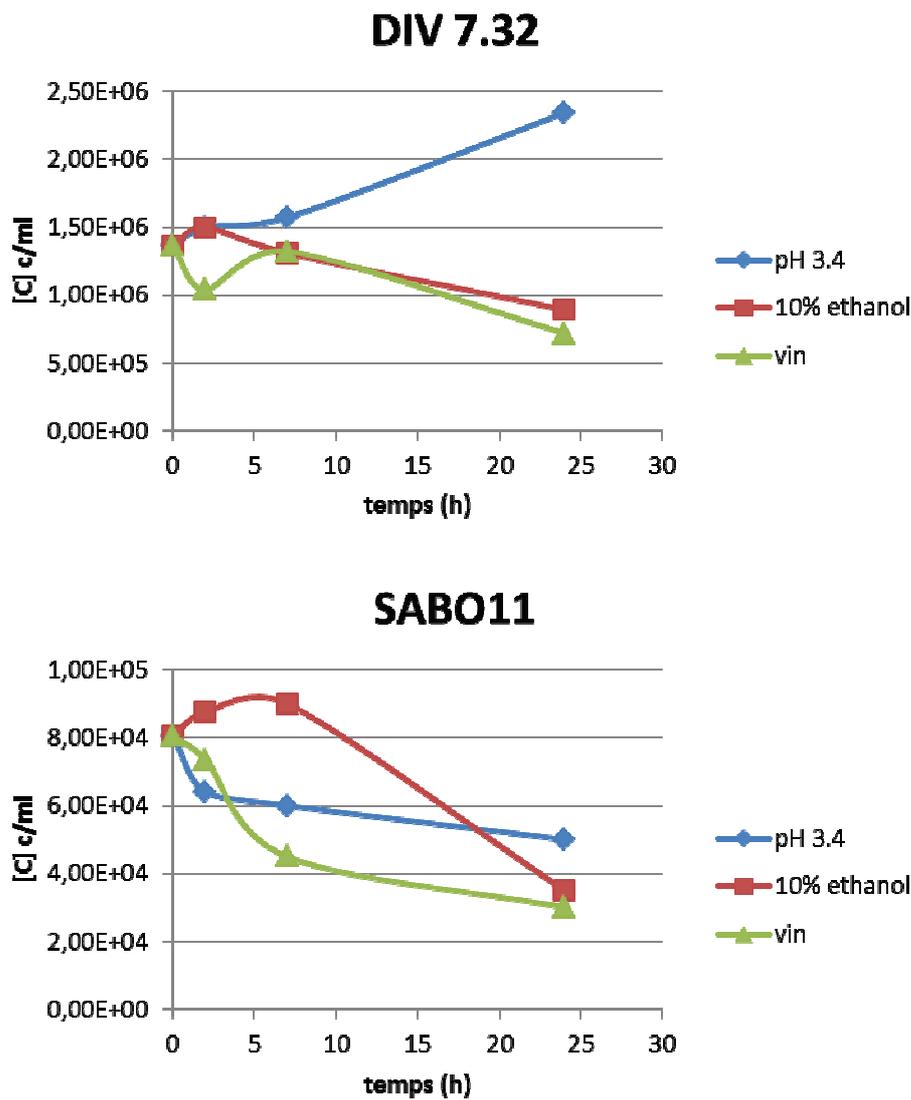


Figure 35 : Courbe des populations de souches DIV 7.32 et SABO11, pendant 24h, dans un milieu MRS dont le pH et la concentration en éthanol ont été modifiés, et dans le vin

	<i>ClpL</i>	<i>CtsR</i>	<i>Hsp18</i>
BL01	+9,36	-3,22	+55,34
DIV 7.27	+15,58	-1,41	+122,15
SABO11	+7,05	-3,03	+47,52

Tableau 13 : Valeurs d'expression relative des gènes *ClpL*, *CtsR* et *Hsp18* en milieu vin, par rapport à l'expression dans un milieu MRS standard, mesurées par qRT-PCR. L'expérience a été réalisée chez trois souches : BL01, DIV 7.27 et SABO11

encore vivantes après différents temps (figure 35). Ces deux souches survivent bien pendant au moins deux heures, sans trop de perte de viabilité. Après ce temps, la viabilité était affectée, au moins pour la souche SABO11 après 7h, et pour les deux souches après 24h. La durée du choc a donc été fixée à 2 heures pour la suite.

L'expérience a été refaite, avec deux autres souches, BL01 et DIV 7.27, où l'incubation de 2 heures a été suivie de l'extraction d'ARN, suivi d'une RT-PCR. Chaque souche a été incubée pendant 2 heures en triplicat dans un milieu MRS témoin, et dans un vin traité au charbon actif. Les ARNs ont été extraits sur les 10ml de culture. L'expérience a montré que l'extraction d'ARN était possible, avec un bon rendement, (ARNs totaux en assez grande quantité, de l'ordre du $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et de qualité suffisante pour les expériences de PCR quantitative. La qualité des ARNs a été mesurée en déposant les produits d'extraction sur gel d'électrophorèse. Si les ARNs sont dégradés, on ne voit qu'un smear. Dans ces expériences, trois bandes de 2,3kb (23S), 1,5kb (16S) et 120pb (5S) correspondant aux ARNs ribosomiques étaient bien visibles. Après rétrotranscription, des PCR quantitatives ont ensuite été réalisées sur les ADNc de ces deux souches, ciblant *clpL*, *ctsR* et *hsp18*, des gènes de réponse au stress déjà connus (Beltramo et al., 2006). Le témoin choisi a été le gène de la *ldh* (Desroche et al., 2005), dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions. Les quatre gènes ciblés ont tous montré un différentiel d'expression, après deux heures de stress, avec des facteurs de surexpression pouvant aller jusqu'à 122 pour *hsp18* chez la souche DIV 7.27 (Tableau 13). Le stress de deux heures est suffisant donc pour induire la réponse de la bactérie. Ces conditions d'expérience ont donc été retenues pour l'analyse de l'expression des gènes par microarray chez cette espèce : elles combinent à la fois une bonne réponse de la bactérie et un maintien suffisant de la survie.

	Nombre de séquences	Taille cumulée (pb)	Taille moyenne (pb)	Taille minimale (pb)	Taille maximale (pb)
PSU1 cds	1 691	1 468 824	869	69	4 428
PSU1 pseudogènes	122	108 243	887	108	2 621
SSH cds (1)	635	278 607	435	83	1 590
Régions cibles (2)	189	208 299	nd	nd	nd
total	2 639	2 066 316	840		

Tableau 14 : Taille et provenance des séquences déposées sur la puce transcriptomique. 1) Gènes issus de comparaison de génomes et d'hybridations soustractives. 2) Régions codant différentes fonctions répertoriées pour *O. oeni* dans genBank

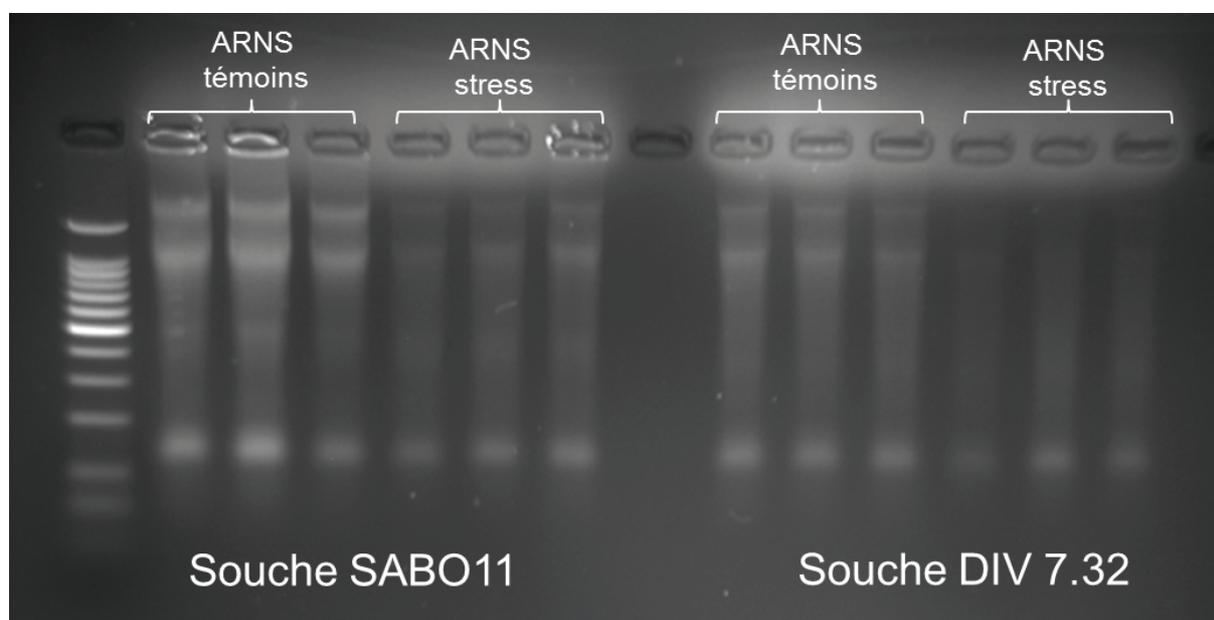


Figure 36 : Analyses sur gel d'électrophorèse des produits d'extraction d'ARN des souches SABO11 et DIV 7.32. Les triplicats des expériences témoins et des expériences de stress ont été déposés

3.2.Expression des gènes analysés par hybridation sur « puce » d'ARN

3.2.1. Étude de la qualité des ARNs et des hybridations

Les ARNs de 7 souches ont été extraits après qu'elles aient été soumises au protocole de stress mis au point ci-dessus. Leur qualité d'abord été vérifiée sur gel d'agarose. Les trois bandes d'ARNs ribosomiaux sont visibles (figure 36), Puis leur qualité a été ensuite vérifiée, par la mesure de RIN (RNA integrity number), à l'aide d'un bioanalyseur. A partir du profil électrophorétique, une valeur de RIN de 5 a été calculée pour nos ARNs (valeur allant de 1 pour des ARNs totalement dégradés à 10 pour des ARNs d'excellente qualité). Cette étude a été réalisée par la société qui a réalisé les hybridations. La qualité des ARNs était moyenne, mais il a quand même été décidé de continuer l'expérience. Par ailleurs, la quantité d'ARNs nécessaire pour l'hybridation sur « puce » étant importante (3µg), l'expérience a été réalisée en deux fois, afin d'avoir la quantité suffisante en ARN. Les expériences d'hybridation des ARNs sur puce, et les mesures et résultats d'hybridation ont été traitées par la société Roche-Nimblegen.

De nombreux contrôles ont été effectués sur les résultats d'hybridation par le laboratoire LABRI. Les valeurs d'hybridation des ADNc avec les séquences déposées sur la lame sont déchiffrées par mesure de la fluorescence. Les résultats permettent de contrôler la répétabilité des hybridations. Ce critère s'ajoute aux triplicats « biologiques » correspondants aux trois extractions d'ARN réalisées pour chacune des cultures. Ces contrôles ont mené à l'élimination de trois souches pour les futures analyses, les résultats étant soit illisibles, soit pas assez fiables et susceptibles de fournir des résultats erronés. La souche PSU1, n'a malheureusement pas pu être retenue car les données acquises pour les trois cultures témoins, et les trois cultures stress n'ont pas satisfait les filtres statistiques. Les souches BL01 et DIV 10.7 n'ont également pas été retenues, à cause de problèmes de répétabilité de résultats pour les hybridations des ADNc correspondants aux cellules incubées dans le vin.

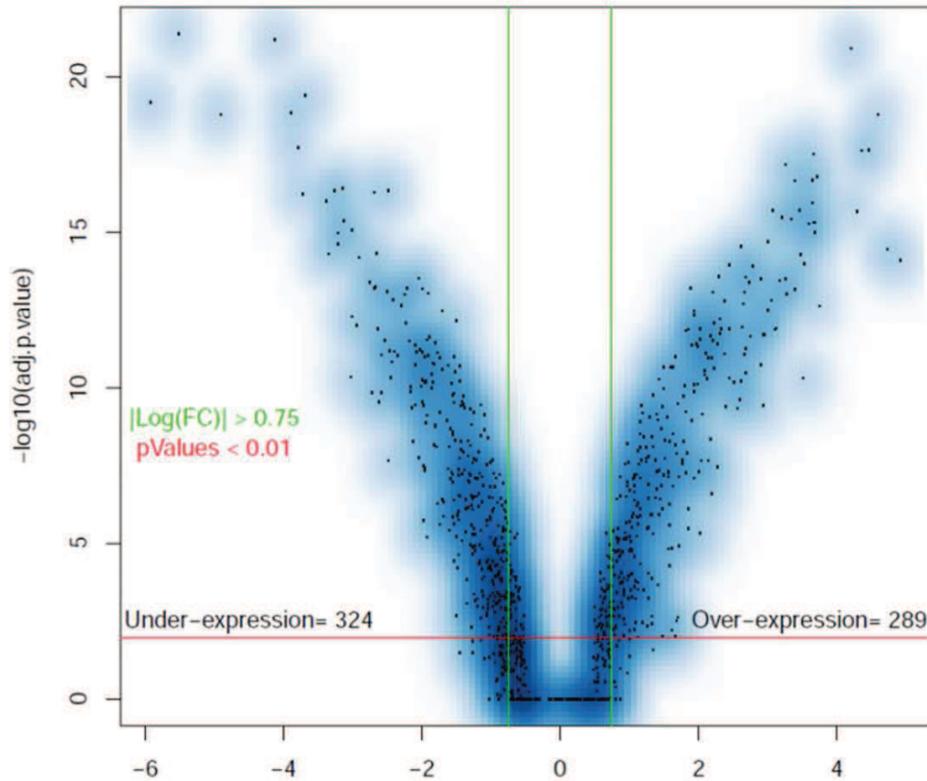


Figure 37 : « volcano plot » des gènes différentiellement exprimés chez la souche DIV 5.23 (Goulielmakis et al, 2008). En abscisse :valeur d'expression relative. en ordonnées : p-value de la différence d'expression.

Souche	DIV 5.23	DIV 5.60	DIV 7.32	SABO11
Nombre total de gènes	2572			
Gènes surexprimés	289	314	294	278
Gènes réprimés	324	357	397	303

Tableau 15 : nombre de gènes surexprimés/réprimés chez les quatre souches utilisées pour l'étude transcriptomique: DIV 5.23, DIV 5.60, DIV 7.32, SABO11

Finalement, seuls les résultats des deux souches isolées de cidre (DIV 5.23 et 5.60) et de deux souches de vin rouge (SABO11 et DIV 7.32) présentaient la qualité requise pour être étudiés plus en détail. Un deuxième filtre des données a consisté à éliminer les gènes non exprimés, ou avec une expression trop faible, trop proche du bruit de fond. Sur les 2572 gènes visés au départ, le nombre dont l'expression varie suite au stress est de 941.

3.2.2. Analyse de l'expression des gènes

Au total, 2639 séquences ont été déposées sur la puce, correspondant à 2572 gènes, avec une couverture de 9X, donc au total 23140 séquences déposées sur la puce (tableau 14). Une organisation des gènes en volcan a mis en évidence les gènes dont l'expression variait le plus, avec les valeurs de p-value les plus faibles (figure 37). Cette présentation, très visuelle, a montré le nombre important de gènes dont l'expression variait, et en fait ressortir quelques-uns. Le niveau d'expression des gènes variait d'un taux d'expression relative de -5,9, correspondant à une répression d'un facteur 60, jusqu'à un taux de + 5,6, surexpression d'un facteur 47. En ce qui concerne les intensités de fluorescence, elles s'échelonnaient entre 5 pour des valeurs proches du bruit de fond, jusqu'à 13, signifiant jusqu'à un facteur de 10^8 de différence d'expression.

Selon les souches, les profils d'expression sont quelquefois très différents. Chaque souche présentait en moyenne trois cent gènes surexprimés et trois cent gènes réprimés (tableau 15). Même si la différence est relativement faible, il y a pour chaque souche plus de gènes réprimés que de gènes surexprimés. Cela signifierait qu'en réponse au stress, un bon nombre de ces gènes ne sont pas indispensables, ou bien que leur répression est un avantage dans le mécanisme de résistance.

Sur les 2572 gènes, et les 921 dont l'expression variait, 136 gènes étaient surexprimés, et 162 gènes réprimés chez toutes les souches. Il est possible que ces gènes soient impliqués dans la réponse globale au stress *d'O. oeni*. Les 623 gènes restants présentaient tous au moins

fonction		sur	sous	Sur cidre	Sous cidre	Sur vin	Sous vin
Métabolisme protéique	métabolisme AA	8	24		8	1	
	traduction		58		3		1
Métabolisme nucléotides		17	4				
Métabolisme sucres		56	4	8		2	
Métabolisme lipides		6	1		1		
Membrane	protéines membranaires	3	13			1	1
	transporteurs	10	28	9	6	2	6
Stress		15	3		1		
Régulateurs de transcription		1	5	1	3		
Fonctions diverses		16	40	4	2	3	11
Fonction inconnue		22	17	5	1	3	5

Tableau 16 : Liste des fonctions des 439 gènes retenus dans l'analyse transcriptomique. Les valeurs indiquent le nombre de gènes dont la fonction est connue. La colonne "sur" regroupe les gènes surexprimés chez toutes les souches, la colonne "sous" les gènes réprimés chez toutes les souches. La colonne "Sur cidre" et "Sous cidre" regroupent les gènes exprimés uniquement chez les souches de cidres (DIV 5.23 et DIV 5.60), respectivement surexprimés et réprimés. Les colonnes "sur vin" et "sous vin" représentent elles les gènes exprimés chez les souches de vin (SABO11, DIV 7.32).

une variation d'expression chez une souche. Pour la plupart d'entre eux, l'interprétation est hasardeuse car elle n'est basée que sur des indications de fonctions tirées des annotations des banques de données. On remarque 69 gènes dont l'expression varie chez les deux souches issues de vin, mais pas chez les souches de cidre. A l'inverse 88 gènes varient chez les souches issues de cidre et pas chez les souches de vin. A ces gènes, s'ajoute un seul gène, surexprimé chez les souches de cidre et réprimé chez les deux souches de vin. Ces gènes peuvent donc être très intéressants, car potentiellement impliqués dans des réponses au stress spécifiques aux souches cidricoles et œnologiques. La différence de phénotype et de génotype des souches cidricoles par rapport aux autres souches pourrait trouver une explication dans la différence d'expression de cet ensemble de 158 gènes.

3.2.3. Etude de la fonction possible des gènes

Parmi l'ensemble des gènes dont l'expression varie, nombreux sont ceux qui codent pour des voies métaboliques et pour des fonctions cellulaires générales. Une liste des gènes qui étaient soit surexprimés/réprimés chez les quatre souches, soit différentiellement exprimés entre les souches de vin et les souches de cidre a été établie. Au total, 439 gènes ont été retenus, 154 surexprimés chez toutes les souches, 197 réprimés, et 88 différentiellement exprimés entre les souches de cidre et de vin. La première remarque est que chez les quatre souches, le choc créé par le vin a entraîné la répression d'un grand nombre de gènes liés aux voies qui concernent la synthèse des protéines, comme la traduction ou le métabolisme d'acides aminés (tableau 16). Ensuite, chez les quatre souches également, de nombreux gènes codant pour des protéines membranaires et des transporteurs sont également réprimés. Pour ces derniers, il s'agit surtout de transporteurs d'acides aminés, de protéines ou de métaux (18 cas sur 28). D'un autre côté, des gènes qui touchent à des métabolismes de sucres sont surexprimés en grande quantité (56). Parallèlement, des gènes codant pour des transporteurs sont surexprimés aussi, et parmi les 32, il s'agit dans 22 cas de transporteurs de sucres. Le

Nom et fonction de la structure opéronique	nb gènes
Structures opéroniques surexprimés :	
Structure opéronique : transport de sucres	4
Structure opéronique: transporteur PTS cellobiose spécifique	3
Opéron arabinose: transport et métabolisme de l'arabinose	4
Opéron <i>pyr</i> : synthèse de pyrimidines	7
Opéron <i>dlt</i> : incorporation de résidus D-alanine dans des acides lipotéchoïques	5
Structure opéronique : transporteur PTS glucose spécifique	4
Opéron galactose	5
Opéron pyruvate déshydrogénase	3
Structure opéronique: transporteur PTS sucre spécifique	4
Structure opéronique : réponse au stress (deux protéines clp)	3
Opéron <i>gerC</i> : biosynthèse de ménaquinone	7
Opéron <i>suf</i> : réponse au stress oxydatif	3
Opéron <i>pur</i> : synthèse de purines	4
Structure opéronique: fonction inconnue	5
Structures opéroniques réprimées :	
Opéron malate	2
Opéron citrate	6
Structure opéronique : gènes ribosomaux	20
Structure opéronique : gènes ribosomaux	5
Opéron <i>cbi</i> : transport cobalt	3
Structure opéronique : transport de spermidine/putrescine	5
Opéron de l'ATP-synthase	4
Structure opéronique : gènes ribosomaux	4
Structure opéronique : transport d'ions métalliques	3
Structure opéronique : fonction inconnue	3
Structure opéronique : gènes ribosomaux	7
Structure opéronique : métabolisme de la biotine	3
Structure opéronique : implication dans le transport acides aminés	5
Opéron <i>opp</i> : transport de peptides	4
Structure opéronique surexprimée chez les souches de cidre :	
Structure opéronique : fonction inconnue	3

Tableau n°17 : liste des structures opéroniques dont l'expression varie suite à un stress de deux heures dans du vin, ressorties de l'analyse microarray. Les structures opéroniques ont été divisées en trois parties : opérons surexprimés chez les quatre souches, opérons réprimés chez les quatre, et la structure opéronique surexprimée chez les souches de cidre (DIV 5.23, DIV 5.60), mais pas chez les souches de vin (SABO11, DIV 7.32).

stress subi par la cellule se traduit donc par une diminution des mécanismes de synthèse protéique, notamment au niveau de la membrane, avec la répression à divers niveaux, transport d'acides aminés et synthèse proprement dite. A l'inverse, on note une activation des systèmes liés au métabolisme des sucres, qu'il s'agisse des voies de transformation ou des transporteurs nécessaires pour l'utilisation de ces sucres. Par ailleurs, les gènes différenciellement exprimés entre les souches de cidre et de vin codent pour la plupart pour des protéines membranaires (transporteurs). De façon très logique, l'agression de la cellule par le stress et son environnement a une grande répercussion sur les gènes codant pour des fonctions membranaires.

Les métabolismes globaux affectés par le stress ont également été étudiés. Il apparaît ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme de sucres sont surexprimées, et peu sont réprimées. A l'inverse, les métabolismes protéiques, ou liés aux acides aminés semblent globalement réprimés ainsi que la traduction générale. Les gènes des opérons ribosomiques, ceux des ARNt, et codant des protéines ribosomiques sont fortement réprimés, comme les ARNt, ou certaines protéines ribosomiques. Cela laisse supposer qu'en réponse au stress, la cellule cesse de faire fonctionner les mécanismes de synthèse de base, qui demandent de l'énergie, et active plutôt ceux qui sont source d'énergie. C'est ce qui impliquerait la surreprésentation de gènes liés à ces métabolismes. Les métabolismes reliés à la formation de matériel nucléique semblent globalement surexprimés, avec notamment deux opérons impliqués dans la synthèse de purines et de pyrimidines. Le métabolisme lipidique semble peu modifié

Des structures opéroniques se dégagent, des groupes de gènes physiquement liés voient leur expression modifiée dans le même sens (tableau17). Ainsi, 14 structures opéroniques ont été surexprimées chez les 4 souches, ainsi que 14 réprimées. De plus une structure opéronique a été découverte, surexprimée seulement chez les souches de cidre en milieu stress Parmi les opérons surexprimés, les opérons impliqués dans la formation de

purines et de pyrimidines sont retrouvés, ainsi que cinq opérons de transporteurs de sucres. La surexpression de l'opéron *dlt*, impliqué dans la synthèse et l'activation de l'acide téchoïque, une molécule importante dans la modification de la structure de la membrane, (Delcour et al., 1999), ainsi que de l'opéron de la pyruvate déshydrogénase sont également observés. Un opéron particulier, comporte trois protéines dont la fonction est inconnue. Parmi les opérons réprimés, quatre sont reliés à des protéines ou ARNs ribosomiques. Trois opérons correspondant à des transporteurs, d'acides aminés, ou de métaux sont retrouvés. Curieusement, l'opéron codant pour l'ATP synthase est également réprimé. Cette protéine est employée dans ces conditions acides, utilisant le gradient de protons existant pour produire de l'énergie (Fillingame, 1997; Boyer, 1997). Il est donc étonnant que ce gène ne soit pas impliqué dans la réponse au stress. Enfin l'opéron citrate et l'opéron malate semble fortement réprimés. Il est possible que l'absence de citrate dans le milieu soit en partie à l'origine de la répression de l'opéron (Martin et al., 2000). Cependant, ce résultat est en opposition avec l'étude de Olguin et al (Olguín et al., 2009), qui ont vu une surexpression du gène de la citrate lyase en condition de stress. Cependant, le stress utilisé (milieu MRS avec une variation de pH et Ethanol), différent de celui employé durant l'étude transcriptomique (vin) explique probablement cette variation.

Toutes les observations précédentes l'ont été sur les gènes qui avaient été surexprimés/réprimés chez les quatre souches. Une cinquantaine de gènes sont aussi différentiellement exprimés chez les souches de cidre et de vin, ainsi qu'une structure opéronique. L'opéron est composé de trois gènes, deux codant pour des protéines hypothétiques, et le dernier gène étant un symporteur Na⁺/xyloside. Sa fonction connue, il pourrait peut-être donc être intéressant dans la compréhension du phénotype particulier des souches de cidre. Parmi les autres gènes, peu de fonctions sont vraiment identifiées, elles restent globalement liées au métabolisme des sucres pour les gènes surexprimés, et encore une fois lié au métabolisme azoté pour les gènes réprimés. En fait dans les gènes spécifiques à la

niche, il semble y a une majorité de transporteurs. Il est peut être possible que la modification de la membrane soit important dans la compréhension de la différence de phénotype de réponse au stress, entre les souches de cidre et de vin.

Par ailleurs, de nombreux gènes connus pour être impliqués dans la réponse au stress chez les bactéries sont surexprimés, mais d'autres aussi réprimés. Ces derniers sont impliqués dans la résistance à des stress a priori non rencontrés dans le vin, comme la résistance aux antibiotiques, ou de toxines. Le premier point concerne une famille de gènes codant pour les *clp* protéases. Neuf gènes sont au total surexprimés (dont des sous-unités de *Clp* ATPases dépendantes, *ClpP*, *ClpL*, *ClpL2*), et une structure opéronique, composée de deux gènes codant pour des *clp* protéases, et d'une protéine hypothétique est reliée à cette famille. A ceci, s'ajoute *hsp18*, une heat shock protein, fortement surexprimée, avec un taux d'expression avoisinant les 4.

Deux autres structures opéroniques sont supposées être impliquées dans la résistance au stress oxydatif. La première structure, composée de gènes heptaprényl diphosphate synthases, et de prényltrasférase, est impliquée dans la synthèse de ménaquinone (ou vitamine K2), une molécule importante et indispensable au transfert d'électrons. Cette molécule a été reconnue comme impliquée dans la résistance des cellules aux radicaux libres, chez les bactéries lactiques (Brooijmans et al., 2009), et dans la résistance au soufre (Hatzios et Bertozzi, 2011). En outre, un autre gène codant pour une protéine de la famille des carboxylyases UbiD est surexprimé, potentiellement impliqué dans la synthèse d'ubiquinone, dont la fonction est voisine de celle de la ménaquinone. L'autre opéron lié à la réponse au stress oxydatif est l'opéron *suf*, qui détermine le piégeage en fer en conditions acides (Jang et Imlay, 2010; Yeo et al., 2006). Les protéines codées interviennent aussi pour conférer la résistance à des métaux comme le cobalt ou le cuivre. Enfin un dernier gène semble impliqué dans cette résistance au stress oxydant. Le gène codant pour la 1,3-propanediol

n° gène	fonction	Δ expression				intensité de fluorescence			
		DIV 5.23	DIV 5.60	DIV 7.32	SABO 11	DIV 5.23	DIV 5.60	DIV 7.32	SABO1 1
41	Major facilitator superfamily permease	3,64	4,35	-0,64	nd	9,94	10,87	8,37	
246	Mannose-6-phosphate isomerase	nd	-0,58	1,33	3,34		9,67	6,79	7,39
250	Multiple sugar-binding protein putative ABC transporter	2,45	2,18	nd	nd	10,04	9,61		
258	Carbamoyl-phosphate synthase large subunit	3,65	3,05	3,59	4,41	10,47	10,65	10,69	10,62
286	Small heat shock protein hsp20	3,28	4,82	3,58	4,54	9,48	9,80	10,39	9,28
326	Pyruvate dehydrogenase (E1) component beta subunit	4,72	5,57	4,69	4,83	10,67	11,15	10,10	10,07
703	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	-1,13	nd	2,96	nd	6,53		8,45	
1026	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	-0,63	nd	2,74	2,18	8,22		8,08	7,53
1060	Heptaprenyl diphosphate synthase component I (putative)	3,07	3,27	2,56	3,11	11,54	11,39	10,57	10,49
1375	Gluconate transport protein	1,16	1,12	-0,88	-1,61	12,22	12,22	10,98	10,66
1567	Sugar kinase, ribokinase family	-0,59	nd	4,41	4,15	9,49		8,89	8,81
1661	scrK Putative fructokinase	4,36	5,15	3,74	5,10	11,95	11,43	11,48	11,07
2073	Sugar phosphotransferase system IIC component	1,84	2,04	nd	nd	8,01	7,93		

Tableau 18 : Liste des gènes retenus pour l'expérience d'étude d'expression chez 9 souches d'*O. oeni*. Les valeurs d'expression relative (delta de Ct) et les intensités de fluorescence (en unités de fluorescence) sont celles obtenues dans l'étude transcriptomique. Les valeurs nd représentent les gènes non différenciellement exprimés.

déshydrogénase est utilisé pour la biosynthèse de glycérolipides et d'éther lipides, ces derniers ayant une fonction antioxydante (Paltauf, 1994).

3.3. Etude de l'expression de gènes par qRT-PCR

3.3.1. Sélection de gènes cibles

Pour d'une part valider les résultats obtenus par microarray et d'autre part étendre l'étude à un plus grand nombre de souches, l'expression des gènes a été mesurée par RT-PCR quantitative. Pour cela, un choix de gènes a été fait parmi ceux qui se sont détachés dans l'étude globale du transcriptome, et un choix de souches a été réalisé dans la collection en tenant compte des premiers résultats de phylogénie et étude des phénotypes. A partir de la liste des 2591 gènes présents sur la puce, le choix s'est porté surtout sur les gènes surexprimés. Le tiers des gènes choisis sont surexprimés chez les quatre souches (tableau 18). Des gènes surexprimés uniquement chez les souches de cidre (DIV 5.23, DIV 5.60), ou celles de vin (SABO11, DIV 7.32) ont également été retenues. Enfin, trois gènes réprimés sur la puce (gènes n°703, 1375, 1549) ont été inclus dans l'analyse, notamment le gène codant pour la gluconate transport protein (n°1375), surexprimé chez les souches de cidre et réprimé chez les souches de vin a été retenu. La valeur d'expression relative de ces gènes dans l'analyse globale était au moins supérieure à 2, pour éviter au maximum les faux positifs. Les autres critères de sélection ont été les fonctions associées à ces gènes et ceux organisés en opérons. Ainsi, des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres, particulièrement surexprimés en condition de stress vin, ont été retenus, notamment celui qui code pour la fructokinase (n°1661), qui possède des expressions relatives aux alentours de 5 (correspondant donc à une surexpression d'un facteur 30). Le gène codant pour la protéine de stress hsp20 (n°286) a également été retenue. Ce sont au total 14 gènes qui ont été étudiés.

N° gène	DIV 5.23	DIV 5.60	SABO11	DIV 7.32
41	3,64	4,35		-0,64
225	3,68	3,51	2,96	3,68
246		-0,58	3,34	1,33
250	2,45	2,18		
258	3,65	3,05	4,41	3,59
286	3,28	4,82	4,54	3,58
326	4,72	5,57	4,83	4,69
703	-1,13			2,96
1026	-0,63		2,18	2,74
1375	1,16	1,12	-1,61	-0,88
1549		-3,57	-2,76	-4,27
1567	-0,59		4,15	4,41
1661	4,36	5,15	5,10	3,74
1288	2,68	4,44	3,76	2,74

n° gène	DIV 5.23	DIV 5.60	SABO11	DIV 7.32
41	2,80	4,19	-0,07	-0,76
225	2,43	2,29	3,48	3,88
246	0,23	0,14	4,81	2,52
250	1,69	1,09	-0,35	-0,53
258	2,70	2,65	5,58	4,54
286	3,42	5,55	5,67	5,57
326	4,89	5,56	6,22	6,09
703	-2,52	-1,72	1,42	3,28
1026	-1,66	-1,67	2,27	2,78
1375	0,49	0,39	-1,83	-0,48
1549	-1,59	-5,46	-3,14	-4,77
1567	-1,80	-1,38	4,31	5,02
1661	5,42	5,78	6,94	5,29
1288	2,46	5,69	4,17	4,76

Tableau 19 : Comparaison des résultats de l'expression de gènes par hybridation sur de la puce transcriptomique, et par RT-PCR quantitative, chez les quatre souches utilisées. Les valeurs d'expression relative des gènes entre le milieu témoin et milieu vin ont été calculées. Le tableau du haut montre les résultats obtenus à partir de la « puce » transcriptomique. Dans celui-ci, les cases vides représentent les gènes dont l'expression ne varie pas significativement. Le tableau du bas, lui, montre les résultats obtenus par l'expérience de qRT-PCR, effectuée ultérieurement. Les cases grisées montrent les valeurs discordantes entre les deux expériences

3.3.2. Validation des résultats obtenus par hybridation de la « puce »

Les mesures des niveaux d'expression des gènes choisis a été faite par qRT-PCR avec comme matrice les ADNc préparés à partir des ARNs analysés par hybridation sur la « puce ». 14 gènes ont été testés, et les expressions relatives de ces gènes, chez les quatre souches ont été comparés aux taux d'expression mesurés sur la puce. La variation d'expression des gènes a été mesurée en fonction d'un gène de référence, dont l'expression ne bouge pas quelles que soient les conditions : la *ldh*, utilisé comme gène de référence pour la plupart des études transcriptomiques chez *O. oeni* (Desroche et al., 2005).

D'après le tableau 19, on observe seulement cinq différences entre les résultats donnés par les deux méthodes. Cela concerne l'expression du gène n°703 chez les souches DIV 5.60 et SABO11, des gènes n°1026 et n°1567 chez SABO11, et du gène n°1549 chez DIV 5.23. Pour tous les autres ARNs, les niveaux mesurés sont du même ordre. Toutefois, les différences sont faibles, de l'ordre de 1 (en expression relative). Ce résultat démontre clairement que dans les conditions expérimentales utilisées, la concordance est bonne entre les méthodes de mesure de l'expression des gènes. D'une part, cela nous permet de valider les résultats de l'étude transcriptomique, mais cela nous permet aussi de poursuivre les investigations par qRT-PCR.

3.3.3. Etude de diversité de transcription chez 9 souches

L'expression des quatorze gènes en réponse à l'inoculation dans du vin a porté sur neuf souches. L'expérience a été réalisée plusieurs mois après l'étude transcriptomique. Pour cette raison, il n'a pas été possible d'utiliser le même vin. Le vin a été décoloré et son pH et titre alcoométrique ont été ajustés aux mêmes valeurs que celles du vin précédent. Mais la composition globale de ces deux vins est forcément différente.

Parmi les neuf souches, la souche isolée de cidre (DIV 5.23), et les deux isolées de vin (SABO11 et DIV 7.32) dont les ADNc avaient été hybridés sur la puce ont été choisies. Les autres étaient la souche PSU1 de référence, la souche DIV 5.18 de cidre, et 4 souches de vin qui avaient des bonnes aptitudes à tolérer les conditions œnologiques, DIV 6.58, DIV 7.64, DIV 7A.7, et SABO16. Une première analyse utilisant un simple test PCR a montré que les 14 gènes étaient présents chez toutes les souches.

Seuls 13 gènes ont pu être étudiés, à cause de problèmes de PCR, qui ont empêché l'obtention des résultats pour le gène n°250 (multiple sugar binding protein, putative ABC transporter). L'expression en conditions de stress des 13 gènes restants a été mesurée par qRT-PCR pour des ARNs extraits après de 2 heures. Le tableau 20 rassemble les résultats d'expression.

En premier lieu, il apparaît que les niveaux d'expression varient peu pour la souche SABO11, et seuls 3 gènes sont réprimés de façon significative (expression relative variant de -1.04 à -2). De même, pour les souches PSU1 et DIV 5.18 respectivement, l'expression est modifiée seulement pour 7 et 6 gènes, et il s'agit toujours d'une diminution. Pour d'autres souches, par exemple DIV 6.58, DIV 7.64, DIV 7A.7 parmi les 13 gènes, 10 sont significativement surexprimés.

Parmi les souches isolées de vin, DIV 6.58, DIV 7.64, DIV 7A.7 sont celles pour lesquelles le nombre de gènes dont le niveau est affecté est le plus important et il s'agit pour la plupart d'entre eux d'une surexpression. Ces trois souches répondent de façon plus homogène que les autres.

Concernant les deux souches de cidre, DIV 5.18 et DIV 5.23, en règle générale, au contraire les gènes sont réprimés, respectivement 6 et 8 gènes sur les 13. Cette première analyse montre donc une très grande variabilité de réponse des souches. D'un autre côté, il apparaît que l'expression d'aucun des gènes n'est affectée de la même manière selon les souches.

Par ailleurs, la comparaison de ces résultats avec ceux du tableau 19 pour les souches DIV 5.23, SABO11 et DIV 7.32 démontre clairement que le niveau d'expression des gènes n'a pas varié de la même façon dans les deux expérimentations, en particulier pour le gène n°1375 codant pour une protéine de transport de gluconate qui avait fait la distinction entre souches de cidre et de vin. Les résultats ne conduisent plus aux mêmes conclusions.

3.4. Discussion

- Réponse des bactéries à l'inoculation dans le vin, au niveau transcriptionnel

Parmi l'ensemble des mécanismes moléculaires vus lors de la réponse au stress vin, plusieurs fonctions se dégagent, étant impliquées dans une résistance au stress oxydatif. Les molécules d'oxygène actives, comme O_2^- , altèrent les protéines, les lipides, les acides nucléiques, et entraînent une mort cellulaire (van de Guchte et al., 2002), avec les membranes directement affectées. La grande variation de protéines membranaires chez *O. oeni* peut être un moyen de la cellule pour modifier la structure de la membrane et ainsi mieux résister au stress. La formation de ménaquinone et ubiquinone, couplées à d'autres systèmes comme l'opéron *suf*, des protéines ou molécules accepteurs d'électrons, rendent les radicaux inactifs et sont autant de moyens pour résister à ce type de stress. Il est intéressant de noter que la ménaquinone a également été associée à la résistance au soufre, et que cette molécule pourrait être impliquée dans la résistance au SO_2 (Hatzios et al., 2011).

Par ailleurs, peu de gènes sont identifiés comme impliqués dans la résistance au stress acide. Ce stress est un des paramètres majeurs de la difficulté d'adaptation au vin et il est étonnant de voir que cela n'apparaisse pas dans les mécanismes de réponse vus. La résistance à l'éthanol n'est apparemment pas non plus visible directement. Cependant, les modifications importantes de la composition de la membrane peuvent être un des mécanismes à la base de ces résistances. Chez *Lactobacillus casei* notamment, il y a une réelle modification de la

composition de la membrane en acide gras (Broadbent et al., 2010). Le ratio entre acide gras saturés et acides gras insaturés dans la membrane change fortement, avec un ratio de 25%/65% respectivement en condition témoin, qui passe à un ratio de 80%/19% en stress acide, rigidifiant la membrane et limitant la baisse de pH et l'entrée de molécules inhibitrices. Ce phénomène a également été montré chez *Lactobacillus brevis* en réponse à un stress acide, ou stress du au houblon (Behr et al., 2006; Grogan et Cronan, 1997). Chez *O. oeni*, cette variation de membrane en réponse à l'éthanol a également été observée (Da Silveira et al., 2003), avec encore une fois une baisse de la fluidité membranaire et une augmentation des acides gras saturés au détriment des acides gras insaturés. Il semble donc que même si aucun mécanisme spécifique à la résistance au stress acide et éthanol chez *O. oeni* n'ait été clairement observé, la variation d'expression d'un grand nombre de protéines membranaires peut être le signe d'une modification importante de la membrane, et donc d'une réponse à ces deux types de stress.

La surexpression de l'opéron *dlt*, codant pour un mécanisme d'alanylation des acides lipotéchoïques, est également intéressante. Ces acides se retrouvent au niveau de la paroi, plus ou moins liés à la membrane et sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires comme l'autolyse (Wecke et al., 1997). Ils semblent également impliqués dans la résistance à certains peptides antimicrobiens chez *Streptococcus pneumoniae* (Kovács et al., 2006) et *Staphylococcus aureus* (Peschel et al., 1999). L'inactivation de l'opéron chez *Streptococcus mutans* a même d'ailleurs provoqué des défauts de croissance et une sensibilité accrue aux conditions acides (Boyd et al., 2000).

Cependant, certains gènes connus et impliqués dans la résistance au stress, semblent ne pas être surexprimés. C'est le cas par exemple pour le régulateur de transcription *ctsR*. Celui-ci est réprimé chez une seule souche, et son expression ne varie pas chez les autres. Ce gène régule négativement l'expression de protéines de réponse au stress comme *hsp18* et *clpP* (Grandvalet et al., 2005; Krüger et al., 2001). L'inactivation de *ctsR* chez *L. sakei* a même

montré une augmentation de la croissance durant la fermentation (Hüfner et al., 2007). La surexpression de *clpP* est bien retrouvée sur la puce, couplée à une légère répression de *ctsR*, qui prouve donc bien l'existence de ce mécanisme de régulation dans la résistance aux conditions du vin.

Par ailleurs la surexpression des gènes *clp* et de *hsp18* peut également être discutée. Les protéases *clp* sont connues pour être impliqués dans la résistance au stress chez de nombreuses bactéries, notamment *O. oeni* (Beltramo et al., 2006; Jobin et al., 1999). Cette famille de protéines possède de nombreuses actions de réponse au stress, comme des réponses au stress salin chez *L. lactis* (Kilstrup et al., 1997), ou au stress de la bile chez *Lactobacillus plantarum* (Bron et al., 2004). Au total, neuf gènes correspondant à des protéases *clp* sont surexprimés. L'importance de cette famille a déjà été observée chez *O. oeni*, en réponse à un stress chaud, ou en réponse à un stress acide (Olguín et al., 2010). Il serait intéressant de connaître plus précisément la fonction précise de ces protéines *clp* ainsi surexprimées lors de l'adaptation au stress vin. De son côté, la protéine *hsp18* est déjà bien connue et sa surexpression a déjà maintes fois été observée en condition de stress, chez *O. oeni* (Beltramo et al., 2006), comme chez d'autres espèces (*Streptomyces albus* (Servant et Mazodier, 1996). L'inactivation de ce gène chez *Lactobacillus plantarum* a provoqué des phases de latence en stress chaud, ainsi qu'une augmentation de la fluidité membranaires (Capozzi et al., 2011). Cette protéine semble donc jouer un rôle important dans la réponse au stress chez *O. oeni*. L'étude de cette protéine, ainsi que les nombreuses protéines *clp* peuvent être intéressantes dans la compréhension de la réponse au stress vin.

La répression de l'opéron de l'ATP synthase est un résultat surprenant, et qui semble au premier abord contradictoire avec ce qui est déjà connu. C'est un transporteur qui utilise normalement le gradient de protons entre le milieu extracellulaire et intracellulaire pour créer de l'énergie. Cette molécule est susceptible d'une part de réguler le pH intracellulaire, mais aussi de produire de l'ATP nécessaire à la survie. La surexpression de ces gènes a même été

observée en condition de stress (Fortier et al., 2003). Cependant, cette surexpression a été observée durant une croissance, et non suite un stress de type choc. Par ailleurs des exemples de répression de cette fonction ont déjà été observés. Il a été montré que l'activité de cette protéine a chuté en réponse à un stress acide (Garbay et Lonvaud-Funel, 1994). Chez *L. casei*, un stress de 20mn en conditions acides a également conduit à une répression forte du gène de l'ATP synthase (Broadbent et al., 2010). La répression de l'ATP synthase peut être expliquée par la volonté de la cellule de diminuer au maximum l'entrée des protons dans des conditions acides. Il est donc possible que ce gène soit réprimé dans un premier temps, pour éviter au maximum la diminution du pH intracellulaire, puis dans un deuxième temps, quand la cellule s'est adaptée à son environnement, ce gène serait exprimé pour exploiter ce gradient de pH important pour former de l'énergie. De façon générale la protéine semble plus vouée à la production d'énergie qu'à l'excrétion de protons. Il semble donc que ce mécanisme de création d'énergie ne soit pas viable lors d'un stress acide, lorsque la cellule n'est pas encore adaptée à son environnement.

- **Un métabolisme cellulaire modifié**

Le nombre important de gènes dont l'expression varie dénote de la modification du métabolisme cellulaire suite au stress vin. Des modifications très importantes de l'expression des gènes sont observées seulement deux heures après le stress. De manière générale, la cellule tend à s'adapter à son environnement. Il semble en effet que sous la pression du stress, la bactérie inhibe les métabolismes azotés, met en sommeil les fonctions les moins importantes pour la survie immédiate. Ainsi, certains gènes codant pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, comme les gènes *sepR* et *mraZ* impliqués dans la croissance cellulaire sont réprimés. Par ailleurs, un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique est surexprimé, en particulier plusieurs enzymes de la voie hétérofermentaire. Cependant, les enzymes d'une branche de cette voie sont au contraire

réprimés. Il s'agit des enzymes qui métabolisent le pyruvate en acétyl-CoA et en lipides. Il semble donc que la dégradation de sucres soit fortement aiguillée vers la production d'énergie plutôt que dans la formation de lipides. La répression de la voie métabolique du citrate est directement reliée à la volonté de la cellule de réprimer la formation de lipides. En effet, le citrate, lorsqu'il est dégradé, forme de l'acétate et de l'oxaloacétate, qui donnent au final de l'acétyl-CoA, qui est le substrat principal de la lipogenèse.

La répression des fonctions de croissance cellulaire et la surexpression des voies énergétiques ont été également observées chez *L. reuteri* dans l'adaptation à un environnement de levain (Hüfner et al., 2008), mais également chez d'autres bactéries lactiques comme *L. sakei* (Hüfner et al., 2007), *L. plantarum* (Vrancken et al., 2011), ou *L. casei* (Broadbent et al., 2010). Dans chaque étude, globalement les mêmes métabolismes et les mêmes mécanismes cellulaires sont surexprimés et réprimés. Bien que le stress rencontré ne soit pas le même, il est intéressant de noter ces similitudes. Chez *L. casei*, des similitudes sont observées dans la réponse transcriptomique au stress acide (Broadbent et al., 2010). Les fonctions secondaires et protéines ribosomales sont fortement réprimées, ainsi que la synthèse d'acides aminés ou les mécanismes impliqués dans la croissance et la reproduction cellulaire, des fonctions non essentielles à la survie immédiate de la cellule. La répression de ces mécanismes a aussi été observée chez *Bacillus subtilis* en réponse au stress (Eymann et al., 2002). Il semble donc que l'ensemble des processus cellulaires impliqués dans la croissance et la production de protéines soit réprimés, quel que soit le stress, et quelle que soit l'espèce bactérienne.

De même, l'importance de la modification de la composition en acides gras des membranes, du turnover des protéines dans la réponse au stress ont également été montrés chez *L. plantarum* (Vrancken et al., 2011), *L. casei* (Broadbent et al., 2010), et *L. reuteri* (Hüfner et al., 2008). La surexpression des gènes impliqués dans la modification des acides lipotéchoïques (opéron *dlt*) est visible dans l'ensemble des publications, sauf chez *L. reuteri*

ou sa répression en milieu acide est contraire à ce qui est observé dans la littérature et ne s'explique pour l'instant pas. Il semble de toute façon que la modification de la membrane soit un des mécanismes majeurs dans la réponse au stress, notamment dans le vin.

Certains mécanismes cellulaires n'ont pas le même impact en condition de stress, selon l'espèce observée. L'importance du métabolisme énergétique ne semble pas être aussi forte chez *L. casei* que chez *O. oeni* dans la réponse au stress. Par exemple, cette espèce ne modifie pas l'expression des enzymes de la voie hétérofermentaire. De même, les mécanismes de biosynthèse de purines et des pyrimidines sont surexprimés chez *O. oeni* alors qu'ils sont réprimés chez les autres espèces. Il a même été montré que la mutation de gènes de biosynthèse de purines chez *L. lactis* augmentait grandement la résistance au stress acide (Rallu et al., 2000). En opposition à ces résultats, l'expression de l'opéron impliqué dans la synthèse des pyrimidines a fait l'objet d'une étude chez plusieurs espèces de *Pseudomonas*, dont *Pseudomonas lundensis* (West, 2009). Il a été surexprimé en absence de pyrimidines dans le milieu. Il est donc possible que la carence en nutriments et autres composés dans le vin soit à l'origine de la surexpression de cet opéron. Les deux études s'opposent et il est difficile de conclure pour l'instant sur le sens de la surexpression de cette fonction.

Le métabolisme de dégradation du malate est habituellement associé à une meilleure adaptation aux conditions acides (García et al., 1992; Poolman et al., 1991; Sheng et Marquis, 2007; Renault et al., 1988). Les enzymes associées sont fortement surexprimées chez *L. casei*. Il est donc surprenant de voir que *O. oeni* réprime ces gènes dans le vin. Cependant le fait d'avoir utilisé des vins en fin de fermentation malolactique pour l'expérience peut expliquer en partie ce résultat. Il est probable que la concentration en malate dans ce vin ne soit pas suffisante pour induire une expression des gènes correspondant. La cellule cherche ainsi probablement d'autres voies et mécanismes de protection, et réprime alors le métabolisme de dégradation du malate.

Il est donc ainsi intéressant d'étudier en particulier la réponse au stress d'*O. oeni*. Le fait qu'elle ait divergé des autres bactéries lactiques (Makarova et Koonin, 2007) a pu entraîner l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance. Parmi les mécanismes globaux de résistance au stress, il est normal d'ailleurs de retrouver certains de ces gènes, bien connus dans la résistance au stress, comme les protéines *clp*, mais certains mécanismes de résistance au stress oxydatifs sont déjà moins courants. Il a donc finalement été montré que certaines voies métaboliques et changements cellulaires étaient spécifiques à la réponse d'*O. oeni* dans le vin, mais il est important de noter que dans toutes ces études, un mécanisme revient systématiquement : la modification de la composition de la membrane, que ce soit au niveau de la modification des acides gras (Broadbent et al., 2010; Da Silveira et al., 2003), ou du turnover des protéines membranaires et transporteurs. L'adaptation de la cellule au stress semble passer systématiquement par des changements moléculaires à ce niveau, quel que soit le stress utilisé.

- Une variabilité d'expression selon la souche

La variabilité d'expression des souches a déjà été montrée chez *O. oeni* (Olguín et al., 2010). L'expression de quatre gènes de métabolisme, *mleA*, *citE*, *ackA*, *alsD* a été étudiée chez quatre souches ayant des propriétés fermentaires différentes. Ce travail a montré des différences d'expression parfois importantes d'une souche à une autre, notamment le gène *citE* seulement surexprimé chez une souche (surexpression d'un facteur 21) en début de fermentation malolactique. Les nouveaux résultats obtenus durant la thèse sont venus confirmer cette constatation. Parmi les 13 gènes testés, chez les 9 souches, leur expression est différente, en comparant les expériences de puce transcriptomique, et ces résultats. L'étude de l'expression de quelques gènes possiblement impliqués dans la réponse au stress chez un groupe de plusieurs souches a donc, en plus des résultats bruts, donné deux principaux enseignements.

Premièrement, le vin utilisé influe directement sur l'expression des gènes en réponse au stress. L'absence de surexpression de la pyruvate déshydrogénase chez DIV 5.18, DIV 5.23, SABO11 et PSU1, ou encore la carbamoyl phosphate synthase, globalement réprimée alors qu'elle était fortement exprimée dans l'étude transcriptomique sont autant d'exemples marquants. Les résultats discordants entre cette expérience et l'étude transcriptomique peuvent être expliquée en partie par l'utilisation de deux vins différents, même si le pH et la concentration en éthanol ont été ajustés. De nombreux autres paramètres ne peuvent pas être contrôlés comme la concentration en SO₂, la composition en tannins, ou le taux de lipides gras, ou peptides antimicrobiens. De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la composition physicochimique des vins. Chaque vin peut ainsi en théorie provoquer une réponse différente et adaptée.

Le deuxième enseignement est que même pour un même vin, les niveaux d'expression de gènes sont très différents d'une souche à l'autre. Dans l'étude d'expression des gènes par qRT-PCR, certains comme la fructokinase (n°1661) sont réprimés chez les souches de cidre (DIV 5.18 et DIV 5.23) et surexprimés chez la plupart des souches de vin. Il semble donc y avoir une certaine variabilité au niveau de la régulation des gènes, et de la transcriptomique. Ce résultat est très important car il dénote de la multitude de réponses différentes possibles à un stress. Chaque souche est donc capable d'une réponse spécifique. Cela veut aussi dire que les observations faites de l'analyse transcriptomique, même si elles nous renseignent sur les possibles mécanismes de réponse de la bactérie au stress vin et peuvent être étudiées en profondeur, ne peuvent pas être utilisées par l'ensemble des souches. Il convient ainsi de rester prudent et ne pas généraliser les résultats obtenus à l'espèce entière.

Ces deux points dénotent de l'extrême complexité de l'étude de la réponse au stress chez les bactéries, et plus particulièrement de l'adaptation d'*O. oeni* au vin. Il paraît ainsi illusoire de se baser sur les résultats d'expression d'une souche dans un vin pour pouvoir se faire une idée de la réponse globale au stress chez cette bactérie. La compréhension du

fonctionnement global de résistance au stress passe par une multiplicité d'expériences du même type que celles présentées dans cette thèse en variant au maximum les vins et les souches. Seul le recoupement de nombreuses expériences semble être la clé pour pouvoir mieux cerner comment les bactéries survivent à leur environnement. Car même si ce raisonnement s'applique à l'espèce *O. oeni* dans ce travail, il est fortement probable que cette constatation se généralise à l'ensemble des bactéries lactiques d'une part, mais également pour la totalité des espèces bactériennes.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude avait pour but de connaître la diversité de l'espèce *Oenococcus oeni*, à travers différentes approches. Elle a poursuivi les travaux effectués antérieurement, en bénéficiant de l'apport important lié à la construction d'une collection importante et très large de 510 souches. La collection a réuni des souches isolées de plusieurs types de vins (rouge, blanc, champagne,...) et de cidres, à des stades de production variables, dans des pays ou régions différentes, et sur une large période de temps.

Dans un premier temps la diversité génétique a été étudiée à l'aide de trois techniques très différentes, et complémentaires. La méthode PFGE a montré qu'elle restait la technique la plus précise pour distinguer les souches. Elle a révélé des réarrangements chromosomiques fréquents. La méthode MLST a également démontré l'importance de la recombinaison, et a permis de délimiter clairement des groupes phylogénétiques au sein de cette espèce. L'étude de la présence de marqueurs (présence associée à une bonne performance œnologique) a donné un premier lien entre le phénotype des souches et leur génotype. Ces deux dernières approches (MLST et d'étude de marqueurs) fournissent de nouveaux outils pour le criblage rapide et la sélection de populations particulières. Ces trois méthodes ont confirmé la grande diversité génétique de l'espèce *O. oeni*. En effet, quelle que soit la technique employée, de nombreux génotypes ont été notés.

Cette étude a permis de confirmer sur un nombre important de souches l'existence de deux sous-populations (A et B) évoluant séparément, sans échange de matériel génétique entre elles. Il semble que les deux populations s'éloignent génétiquement l'une de l'autre au fur et à mesure de l'évolution, et ce phénomène pourrait aboutir dans le futur à l'apparition de deux espèces distinctes. Par ailleurs, des sous-groupes phylogénétiques ont été trouvés pour la première fois. Ils ont certainement une signification puisqu'ils correspondent généralement à des niches particulières. Ainsi certaines souches de Champagne et Bourgogne sont génétiquement différentes des autres. Les populations chiliennes et sud-africaines sont

également distinctes des autres. Les souches isolées de cidre ont un génotype particulier, toutes les souches étant groupées en B. Par ailleurs, pour la première fois, les souches du groupe phylogénétique A apparaissent globalement plus adaptées au milieu œnologique par leur réponse aux différents tests. Il faut noter également que la quasi-totalité des levains malolactiques testés dans cette étude sont dans le ce même groupe. D'autre part, l'étude de la présence de marqueurs, associés à une bonne performance œnologique, a montré, quelle que soit la série de marqueurs employés, que les souches possédant le plus de marqueurs étaient systématiquement du groupe A. Il semble donc exister une convergence de toutes ces approches au plan de l'analyse génétique.

Concernant les caractères phénotypiques, on observe une très grande variation de comportement de croissance et de survie dans des milieux acides et riches en éthanol. Les variations pouvaient aller de l'absence totale de survie à une croissance plus facile comparée à celle de milieu standard de laboratoire. D'un autre côté, les souches ont des capacités variables à fermenter divers sucres, dont la plupart sont présents dans le vin. De façon très inattendue, toutes les souches d'*O. oeni* ne fermentaient pas certains sucres considérés comme incontournables comme le glucose et le fructose.

Outre la mise en évidence de la diversité de caractères phénotypiques, le résultat majeur de cette étude est la démonstration que les souches du groupe phylogénétique A sont globalement mieux adaptées à des conditions proches de l'œnologie que les souches du groupe phylogénétique B. Ce résultat vient conforter les résultats de l'analyse génomique de cette collection. Parmi ce groupe, les souches du sous-groupe phylogénétique A1b se distinguent par leur très bon comportement dans les milieux se rapprochant le plus du vin.

De plus, bien que ce soit attendu, il ressort que les souches du cidre présentaient un phénotype vraiment différent des autres, avec notamment des meilleures croissances dans les milieux sans éthanol, mais survivant très mal dans les milieux très acides. Ce fait est

certainement à relier aux conditions de l'élaboration des cidres et de leur nature. Le cidre et le vin n'ont pas les mêmes concentrations en éthanol, et surtout les mêmes compositions globales en nutriments et inhibiteurs pour la croissance. Il est logique que les souches d'*O. oeni* n'aient pas le même comportement.

La réussite de l'étude de la diversité phénotypique repose sur le criblage d'un nombre très important de souches. Avec les nouveaux outils permettant une automatisation des pipetages et des lectures de résultats, nous avons pu établir un protocole efficace. Il nous a permis de traiter plusieurs milliers de cultures, pour mesurer le comportement de la collection, dans neuf milieux différents et trois réplicats pour chaque condition. Dans les conditions d'expérience choisies, les levains malolactiques commercialisés ne sont pas ressortis de l'analyse. Il reste à savoir si la technique pourrait être adaptée et retravaillée pour être un outil efficace de sélection de levains par les industriels.

Pour tenter de mettre en relation les résultats de l'analyse génomique et celle des comportements des souches, l'expression des gènes a été étudiée suite à l'inoculation dans du vin. Dans un premier temps, de nombreuses modifications ont été révélées. Il s'agit de variations communes, comme une baisse générale des fonctions de traduction et de croissance cellulaires, et une augmentation du métabolisme énergétique. C'est aussi le cas de plusieurs gènes déjà connus pour être impliqués dans la réponse générale au stress comme les protéines clp. Contrairement à notre première attente, peu de mécanismes ou fonctions ont été trouvées pour expliquer la variation de réponse entre les bactéries issues de cidre et de vin.

Mais le renouvellement de l'étude de l'expression lors de l'inoculation dans un vin différent du premier n'a pas permis de confirmer les résultats obtenus ni sur la puce transcriptomique, ni par RT-PCR. Ce résultat est fondamental. Il démontre qu'une souche ne répond pas de la même façon au stress, suivant l'inoculation dans les vins de compositions différentes, au pH et titre alcoométrique variables.

Le vin est un environnement tellement complexe que d'une année sur l'autre, d'une région à une autre, la composition change, et fait varier grandement la réponse. En outre, il n'existe pas de réponse commune de toutes les souches. Il paraît donc exclu de trouver un mécanisme global de résistance au stress subi par les bactéries inoculées dans du vin. Toutefois, certaines fonctions et métabolismes ont pu être mis en lumière.

En conclusion, cette étude établit une relation claire entre les caractères phénotypiques analysés et le génotype des souches. Mais elle ne fournit pas le catalogue de gènes et fonctions associées qui sont à l'origine de l'adaptation des souches à la survie et à la croissance dans le vin. Des réseaux de gènes et de régulateurs réagissent à la complexité des signaux reçus par la bactérie dans son environnement.

En revanche, dans un but d'amélioration de la sélection de souches pour la préparation de levains malolactiques, la fréquence de certains marqueurs et l'appartenance à des groupes phylogénétiques pourraient être de bonnes pistes à explorer. En effet, la mise en relation des résultats révèle que les souches les plus performantes se trouvent en majorité dans le groupe phylogénétique A. Toutefois, la variabilité est importante dans l'espèce, au sein de chaque population, et des souches candidates pour des levains peuvent exister dans le groupe B. Mais en première analyse, il semble plus judicieux de se focaliser sur les souches du groupe A dans la recherche de futurs levains malolactique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aertsen, A., et Michiels, C. W. (2005). Diversify or die, generation of diversity in response to stress. *Crit. <rev. <microbial.* *31*, 69-78.
- Alberto, M. R., Farías, M. E., et Manca de Nadra, M. C. (2011). Effect of Gallic Acid and Catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w Growth and Metabolism of Organic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 4359-4363.
- Arnaud-Haond, S., et Belkhir, K. (2007). Genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* *7*, 15-17.
- Avedovech, R. M., Mcdaniel, M. R., Watson, B. T., et Sandine, W. E. (1992). An Evaluation of Combinations of Wine Yeast and *Leuconostoc oenos* Strains in Malolactic Fermentation of Chardonnay Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* *43*, 253-260.
- Barbagallo, R. N. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* *34*, 292-296.
- Beelman, R. B., McArdle, F. J., et Duke, G. R. (1980). Comparison of *Leuconostoc Oenos* Strains ML-34 and PSU-1 to Induce Malo-Lactic Fermentation in Pennsylvania Red Table Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* *31*, 269-276.
- Behr, J., Gänzle, M. G., et Vogel, R. F. (2006). Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol* *72*, 6483-6492.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., et Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France), available at <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/intro.htm>. Available at: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm> [Accédé Mai 3, 2010].
- Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C., et Guzzo, J. (2006). Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology* *157*, 267-274.
- Bertrand, A., Smirou-Bonnamour, C., et Lonvaud-Funel, A. (1984). Aroma compounds formed in malolactic fermentation. proceedings of the Alko Symposium on flavour research of alcoholic. *Biotech Indus Ferm Res*, 39-49.
- Bilhère, E. (2008). Etude de la diversité génétique intraspécifique chez la bactérie lactique *Oenococcus oeni*.
- Bilhère, E., Lucas, P. M., Claisse, O., et Lonvaud-Funel, A. (2009). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenetic recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 1291-1300.
- Bon, E., Delaherche, A., Bilhère, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A., et Le Marrec, C. (2009). *Oenococcus oeni* Genome Plasticity Is Associated with Fitness. *Appl Environ*

- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int. J. Food Microbiol* 78, 19-30.
- Borneman, A., Bartowsky, E., McCarthy, J., et Chambers, P. (2010). Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by high-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2425-6> [Accédé Février 16, 2010].
- Bourdineaud, J. (2006). Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol* 107, 274-280.
- Bourdineaud, J., Nehmé, B., Tesse, S., et Lonvaud-Funel, A. (2003). The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 2512-2520.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Neuhaus, F. C., et Hamilton, I. R. (2000). Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J. Bacteriol* 182, 6055-6065.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem* 66, 717-749.
- Broadbent, J. R., Larsen, R. L., Deibel, V., et Steele, J. L. (2010). Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *J Bacteriol* 192, 2445-2458.
- Bron, P. A., Marco, M., Hoffer, S. M., Van Mullekom, E., de Vos, W. M., et Kleerebezem, M. (2004). Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *J. Bacteriol* 186, 7829-7835.
- Brooijmans, R., Smit, B., Santos, F., van Riel, J., de Vos, W. M., et Hugenholtz, J. (2009). Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact* 8, 28.
- Brul, S., et Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol* 50, 1-17.
- Capozzi, V., Weidmann, S., Fiocco, D., Rieu, A., Hols, P., Guzzo, J., et Spano, G. (2011). Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Res. Microbiol* 162, 419-425.
- Cappello, M. S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A., et Zapparoli, G. (2008). Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *Int J Food Microbiol* 127, 241-5.
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Stefani, D., et Logrieco, A. (2010). Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Syst. Appl. Microbiol* 33, 461-467.

- Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A., et Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett* 211, 155-159.
- Champomier Vergès, M. C., Zuñiga, M., Morel-Deville, F., Pérez-Martínez, G., Zagorec, M., et Ehrlich, S. D. (1999). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett* 180, 297-304.
- Chang, Y. Y., et Cronan, J. E. (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 33, 249-259.
- Chen, Y. M., Weaver, C. A., et Burne, R. A. (2000). Dual Functions of *Streptococcus salivarius* Urease. *J. Bacteriol.* 182, 4667-4669.
- Collins, E. (1972). Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganisms. *Journal of Dairy Science* 55, 1022-1028.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., et Guzzo, J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol* 105, 463-470.
- D'Incecco, N. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* 21, 257-265.
- Da Silveira, M. G., Golovina, E. A., Hoekstra, F. A., Rombouts, F. M., et Abee, T. (2003). Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microbiol* 69, 5826-32.
- Daniel, P., Waele, E., et Hallet, J. (1993). Optimization of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38. Available at: <http://www.springerlink.com/content/kp6501k8370175g1/> [Accédé Novembre 4, 2011].
- Dashper, S. G., et Reynolds, E. C. (1992). pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res* 71, 1159-1165.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., et Fleet, G. H. (1985). Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.
- De Las Rivas, B., Marcobal, A., et Munoz, R. (2004). Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7210-7219.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., et Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 159-184.
- Desroche, N., Beltramo, C., et Guzzo, J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Microbiol. Methods* 60, 325-333.

- Dick, K. J., Molan, P. C., et Eschenbruch, R. (1992). The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. *Vitis* 31, 105-116.
- Dicks, L. M., Dellaglio, F., et Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45, 395.
- Dicks, L. M. T., Van Vuuren, H. J. J., et Dellaglio, F. (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 40, 83-91.
- Edwards, C. G., Beelman, R. B., Bartley, C. E., et McConnell, A. L. (1990). Production of Decanoic Acid and Other Volatile Compounds and the Growth of Yeast and Malolactic Bacteria During Vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 48-56.
- Edwards, C. G., Jensen, K. A., Spayd, S. E., et Seymour, B. J. (1991). Isolation and Characterization of Native Strains of *Leuconostoc oenos* from Washington State Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 219-226.
- Efron, B. (1979). Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics* 7, 1-26.
- Endo, A., et 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, 2345-8.
- Enright, M. C., et Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 7, 482-7.
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., et Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 184, 2500-2520.
- Farrow, J. A. E., Facklam, R. R., et Collins, M. D. (1989). Nucleic Acid Homologies of Some Vancomycin-Resistant *Leuconostocs* and Description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 39, 279-283.
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., et Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol* 25, 105-112.
- Fillingame, R. H. (1997). Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol* 200, 217-224.
- Fortier, L., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., Lee, B. H., et Guzzo, J. (2003). Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol Lett* 222, 165-9.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres,

- C., et Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett* 230, 53-61.
- Garbay, S., et Lonvaud-Funel, A. (1996). Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *J Appl Microbiol* 81, 619-625.
- Garbay, S., et Lonvaud-Funel, A. (1994). Characterization of membrane-bound ATPase activity of *Leuconostoc oenos*: growth conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 597-602.
- García, M. J., Zúñiga, M., et Kobayashi, H. (1992). Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220. *Journal of General Microbiology* 138, 2519 -2524.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., et Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol* 145, 426-431.
- Garvie, E. I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J. Gen. Microbiol* 48, 431-438.
- Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc*. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*.
- Garvie, E. I. (1981). Sub-divisions within the genus *Leuconostoc* as shown by RNA/DNA hybridization. *Journal of General Microbiology* 127, 209-212.
- Garvie, E. I. (1976). Hybridization between the deoxyribonucleic acids of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26, 116-122.
- Garvie, E. I., et Farrow, J. A. E. (1980). The Differentiation of *Leuconostoc Oenos* from Non-Acidophilic Species of *Leuconostoc*, and the Identification of Five Strains from the American Type Culture Collection. *Am. J. Enol. Vitic.* 31, 154-157.
- Giard, J. C., Hartke, A., Flahaut, S., Benachour, A., Boutibonnes, P., et Auffray, Y. (1996). Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol* 32, 264-271.
- Graca da Silveira, M., Vitoria San Romao, M., Loureiro-Dias, M. C., Rombouts, F. M., et Abee, T. (2002). Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6087-6093.
- Grandvalet, C., Assad-García, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., et Tourdot-Maréchal, R. (2008). Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 2611-2619.
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C., et Guzzo, J. (2005). *CtsR* is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *J. Bacteriol* 187, 5614-5623.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., et Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol* 105, 233-244.

- Grogan, D. W., et Cronan, J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 429-441.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 187-216.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P., et Vincenzini, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food Microbiol* 83, 1-14.
- Guerzoni, M. E., Sinigaglia, M., Gardini, F., Ferruzzi, M., et Torriani, S. (1995). Effects of pH, Temperature, Ethanol, and Malate Concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: Modelling of the Malolactic Activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 368-374.
- Guzzo, J., Jobin, M., et DiviÃ's, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters* 160, 43-47.
- Hartke, A., Bouche, S., Gansel, X., Boutibonnes, P., et Auffray, Y. (1994). Starvation-Induced Stress Resistance in *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403. *Appl Environ Microbiol* 60, 3474-3478.
- Hatzios, S. K., et Bertozzi, C. R. (2011). The regulation of sulphur metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos pathogene* 7.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 4, 341-346.
- Henick-Kling, T., Sandine, W. E., et Heatherbell, D. A. (1989). Evaluation of Malolactic Bacteria Isolated from Oregon Wines. *Appl Environ Microbiol* 55, 2010-2016.
- Hontebeyrie, M., et Gasser, F. (1977). Deoxyribonucleic Acid Homologies in the Genus *Leuconostoc*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27, 9 -14.
- Hüfner, E., Britton, R. A., Roos, S., Jonsson, H., et Hertel, C. (2008). Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Syst. Appl. Microbiol* 31, 323-338.
- Hüfner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A., Zagorec, M., et Hertel, C. (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl. Environ. Microbiol* 73, 2522-2531.
- Huson, D. H., et Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23, 254-267.
- Ingram, L. O., et Buttke, T. M. (1984). Effects of alcohols on micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol* 25, 253-300.
- Jang, S., et Imlay, J. A. (2010). Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* *Isc* iron-

- sulphur assembly system, and *OxyR* induces the *Suf* system to compensate. *Mol. Microbiol* 78, 1448-1467.
- Jenkins, D. E., Chaisson, S. A., et Matin, A. (1990). Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 172, 2779-2781.
- Jenkins, D. E., Schultz, J. E., et Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 170, 3910-3914.
- Jobin, M. P., Garmyn, D., Diviès, C., et Guzzo, J. (1999). Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 5), 1245-1251.
- Jolley, K. A., Feil, E. J., Chan, M. S., et Maiden, M. C. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230-1.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., et Pretorius, I. S. (2003). The Effect of Non-Saccharomyces Yeasts on Fermentation and Wine Quality. *S Afr J Enol Vitic* 24, 8-10.
- Jouper-Jaan, Å., Goodman, A. E., et Kjelleberg, S. (1992). Bacteria starved for prolonged periods develop increased protection against lethal temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 10, 229-236.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 209-224.
- Kelly, W. J., Huang, C. M., et Asmundson, R. V. (1993). Comparison of *Leuconostoc oenos* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 59, 3969-3972.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., et Vogensen, F. K. (1997). Induction of heat shock proteins *DnaK*, *GroEL*, and *GroES* by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 63, 1826-1837.
- Kim, W. S., Ren, J., et Dunn, N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett* 171, 57-65.
- Kim, W. S., Park, J. H., Tandianus, J. E., Ren, J., Su, P., et Dunn, N. W. (2002). A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. *FEMS Microbiol. Lett* 212, 203-208.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol* 16, 111-120.
- King, S. W., et Beelman, R. B. (1986). Metabolic Interactions Between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a Model Grape Juice/Wine System. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 53-60.
- Knoll, C., Divol, B., et du Toit, M. (2008). Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiol* 25, 983-91.
- Kogure, K., Simidu, U., et Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for

- counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol* 25, 415-420.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., et Brückner, R. (2006). A Functional *dlt* Operon, Encoding Proteins Required for Incorporation of d-Alanine in Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 188, 5797-5805.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H., et Hecker, M. (2001). *Clp*-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J* 20, 852-863.
- Kunji, E. R., Ubbink, T., Matin, A., Poolman, B., et Konings, W. N. (1993). Physiological responses of *Lactococcus lactis* ML3 to alternating conditions of growth and starvation. *Archives of Microbiology* 159, 372-379.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and Brandy. *Biotechnology* 5, 81-163.
- Lamoureux, M., Prévost, H., Cavin, J. F., et Diviès, C. (1993). Recognition of *Leuconostoc oenos* strains by the use of DNA restriction profiles. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 39, 547-552.
- Larisika, M., Claus, H., et 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, 171-6.
- Le Jeune, C., et Lonvaud-Funel, A. (1997). Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): application to strain differentiation. *Res. Microbiol* 148, 79-86.
- Lechiancole, T., Blaiotta, G., Messina, D., Fusco, V., Villani, F., et Salzano, G. (2006). Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst. Appl. Microbiol* 29, 375-381.
- Librado, P., et Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lonvaud, M. (1975). Recherches sur l'enzyme des bactéries lactiques assurant la transformation du malate en lactate. Thèse doctorale, Université Bordeaux 2.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., et Joyeux, A. (1988). Une altération bactérienne des vins: la "maladie des vins filants". *Science des aliments*, 33-49.
- Lonvaud-Funel, A., Zmirou, C., et Weinzorn, F. (1984). Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries de la fermentation malolactique des vins. *Science des aliments*, 81-85.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., et Ruiz-Larrea, F. (2007). Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine

- spontaneous malolactic fermentations. *European Food Research and Technology* 226, 215-223.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3140-5.
- Maiden, M. C. J. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60, 561-88.
- Makarova, K. S., et Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 189, 1199-208.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., et Dellaglio, F. (2003). Adaptation in Amarone wine of indigenous *Oenococcus oeni* strains differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. *Annals of Microbiology* 53, 55-61.
- Man, J. C. D., Rogosa, M., et Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23, 130-135.
- Marcobal, A. M., Sela, D. A., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., et Mills, D. A. (2008). Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *J. Bacteriol.* 190, 564-570.
- Martin, M., Magni, C., Lopez, P., et de Mendoza, D. (2000). Transcriptional Control of the Citrate-Inducible citMCDEFGRP Operon, Encoding Genes Involved in Citrate Fermentation in *Leuconostoc paramesenteroides*. *J. Bacteriol.* 182, 3904-3912.
- Martineau, B., et Henick-Kling, T. (1995). Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J Appl Microbiol* 78, 526-536.
- Martinez-Murcia, A. J., et Collins, M. D. (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett* 58, 73-83.
- Martinez-Murcia, A. J., Harland, N. M., et Collins, M. D. (1993). Phylogenetic analysis of some *Leuconostocs* and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol* 74, 532-541.
- Matic, I., Rayssiguier, C., et Radman, M. (1995). Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* 80, 507-515.
- Mellefont, L. A., McMeekin, T. A., et Ross, T. (2003). The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 83, 281-293.
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., et Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 465-475.
- Morgan, S., Hill, C., et Ross, R. P. (2002). Preservation and fermentation: past, present and

- future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Mortimer, R., et Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol* 150, 199-204.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., et Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Sáenz, J., Ruiz-Larrea, F., et Torres, C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol* 88, 44-51.
- Nei, M., et Chesser, R. K. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet* 47, 253-259.
- Nei, M., et Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76, 5269-5273.
- Olguín, N., Bordons, A., et Reguant, C. (2009). Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 26, 197-203.
- Olguín, N., Bordons, A., et Reguant, C. (2010). Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *International Journal of Food Microbiology* 144, 88-95.
- Paltauf, F. (1994). Ether lipids in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids* 74, 101-139.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., et Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem* 274, 8405-8410.
- Peynaud, E., et Domercq, S. (1959). Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification. *compte rendu de l'académie d'agriculture* 45, 355.
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P., et Konings, W. N. (1991). Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J Bacteriol* 173, 6030-6037.
- Poolman, B., Smid, E. J., Veldkamp, H., et Konings, W. N. (1987). Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *J Bacteriol* 169, 1460-1468.
- Prunier, A., et Leclercq, R. (2005). Role of *mutS* and *mutL* genes in hypermutability and recombination in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol* 187, 3455-3464.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2000). Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* : identification of intracellular stress signals. *Mol. Microbiol* 35, 517-528.
- Rayssiguier, C., Thaler, D. S., et Radman, M. (1989). The barrier to recombination between

- Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342, 396-401.
- Reguant, C., et Bordons, A. (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol* 95, 344-353.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., et Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *J. Appl. Microbiol* 88, 1065-1071.
- Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M., et Bordons, A. (2005). Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiol. Lett* 246, 111-117.
- Renault, P., Gaillardin, C., et Heslot, H. (1988). Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 375-379.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., et Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol* 134, 201-210.
- Renouf, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du Vin. Available at: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000340/> [Accédé Novembre 1, 2011].
- Renouf, V., Claisse, O., et Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 75, 149-164.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., et Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem* 47, 4003-4008.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., et lonvaud-Funel, A. (1998). *Traité d'oenologie vol.2* librairie polytechnique Béranger. (Paris).
- Ribéreau-Gayon, P. (1991). *Le vin* Presses universitaires de France. (Paris).
- Richter, H., Hamann, I., et Uden, G. (2003). Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. *Arch. Microbiol* 179, 227-233.
- Rodriguez, S. B., Amberg, E., Thornton, R., et McLellan, M. (1990). Malolactic fermentation in Chardonnay: growth and sensory effects of commercial strains of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Microbiol* 68, 139-144.
- Romano, P., et Suzzi, G. (1993). Sulphur dioxide and wine micro organisms. in : *Wine Microbiology and Biotechnology*. Hardwood Academic publishers, chur, Switzerland, 373-393.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K., et Yokotsuka, K. (2001).

- Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. FEMS Microbiology Letters 202, 109-114.
- Schillinger, U., Holzapfel, W., et Kandler, O. (1989). Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 12, 48-55.
- Schütz, M., et Radler, F. (1973). The "malic enzyme" from *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. Arch Mikrobiol 91, 183-202.
- Servant, P., et Mazodier, P. (1996). Heat induction of hsp18 gene expression in *Streptomyces albus* G: transcriptional and posttranscriptional regulation. J Bacteriol 178, 7031-7036.
- Sheng, J., et Marquis, R. E. (2007). Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett 272, 196-201.
- Stevens, S., et Hofmeyr, J. (1993). Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 38. Available at: <http://www.springerlink.com/content/hq21200264704ph5/> [Accédé Novembre 4, 2011].
- Strasser de Saad, A. M., et Manca de Nadra, M. C. (1993). Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. J. Appl. Bacteriol 74, 406-410.
- Stuart, M. R., Chou, L. S., et Weimer, B. C. (1999). Influence of Carbohydrate Starvation and Arginine on Culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl Environ Microbiol 65, 665-673.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., et Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol 24, 1596-1599.
- Teixeira, H., Goncalves, M., Rozes, N., Ramos, A., et San Romao, M. (2002). Lactobacillic Acid Accumulation in the Plasma Membrane of *Oenococcus oeni*: A Response to Ethanol Stress? Microbial Ecology 43, 146-153.
- Tenreiro, R., Santos, M. A., Paveia, H., et Vieira, G. (1994). Inter-strain relationships among wine *Leuconostocs* and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. J. Appl. Bacteriol 77, 271-280.
- Tonon, T., et Lonvaud-Funel, A. (2000). Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. J. Appl. Microbiol 89, 526-531.
- Tourdot-Maréchal, R., Fortier, L. C., Guzzo, J., Lee, B., et Diviès, C. (1999). Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. FEMS Microbiol. Lett 178, 319-326.
- Tracey, R. P., et Britz, T. J. (1987). A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. J Appl Microbiol 63, 523-532.

- Ugliano, M., Genovese, A., et Moio, L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem* 51, 5073-5078.
- Vigentini, I., Picozzi, C., Tirelli, A., Giugni, A., et Foschino, R. (2009). Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *International Journal of Food Microbiology* 136, 123-128.
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H., et van Dijken, J. P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56, 3785-3792.
- Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L., et Ventura, S. (1996). Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res. Microbiol* 147, 651-660.
- Vivas, N., Augustin, M., et Lonvaud-Funel, A. (2000). Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J. Sci. Food Agric.* 80, 1675-1678.
- Vivas, N., Bellemère, L., Lonvaud-Funel, A., et Glories, Y. (1995). Etudes sur la fermentation malolactique des vins rouges en barriques et en cuves. *Revue française des oenologues* 149, 37-42.
- Vrancken, G., De Vuyst, L., Rimaux, T., Allemeersch, J., et Weckx, S. (2011). *Lactobacillus plantarum* IMDO 130201, a wheat sourdough isolate, adapts to growth in wheat sourdough simulation medium at different pH values through differential gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.02668-10.
- Wecke, J., Madela, K., et Fischer, W. (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 143, 2953 -2960.
- West, T. P. (2009). Regulation of pyrimidine formation in *Pseudomonas lundensis*. *Can. J. Microbiol* 55, 261-268.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., et Lee, T. H. (1985). Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 302-313.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol* 60, 1136-1151.
- Xu, H., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., et Colwell, R. R. (1982). Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. *Microbial Ecology* 8, 313-323.
- Yang, D., et Woese, C. (1989). Phylogenetic structure of the "*Leuconostocs*" : an interesting case of rapidly evolving organism. *Systematic and Applied Microbiology* 12, 145-149.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K., Ludwig, W., Glöckner, F. O., et Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: a

- 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* *31*, 241-50.
- Yeo, W., Lee, J., Lee, K., et Roe, J. (2006). *IscR* acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol* *61*, 206-218.
- Young, D. M., et Ornston, L. N. (2001). Functions of the mismatch repair gene *mutS* from *Acinetobacter sp.* strain ADP1. *J. Bacteriol* *183*, 6822-6831.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., et Dellaglio, F. (2000). Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr. Microbiol* *40*, 351-355.
- Zavaleta, A. I., Martínez-Murcia, A. J., et Rodríguez-Valera, F. (1997). Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* *63*, 1261-7.
- Zavaleta, A. I., Martinez-Murcia, A. J., et Rodriguez-Valera, F. (1996). 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology* *142*, 2105-2114.
- Zhang, D., et Lovitt, R. W. (2005). Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *J. Appl. Microbiol* *99*, 565-572.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., et Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* *125*, 197-203.

INDEX

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
ATCC 23277	Aquitaine	1967	Rouge							
ATCC 23279	Aquitaine	1967	Rouge							
ATCC-BAA 1163 B16	Aquitaine		Rouge	x	B2		x	x	2	x
BLO1	Champagne		Champagne	x	A1		x	x	3	
DIV 10.10	Champagne		Champagne	x	A1d	x	x	x	2	x
DIV 10.11	Aquitaine		Rouge	x	A3	x	x	x	3	x
DIV 10.12	Aquitaine		Rouge	x	A2	x	x	x	3	x
DIV 10.13	Aquitaine		Rouge	x	A3	x	x	x	3	x
DIV 10.14	Languedoc		Rouge	x	A2	x	x	x	1	
DIV 10.2	Languedoc		Rouge							
DIV 10.2	Aquitaine		Rouge	x	A1b	x	x	x	1	
DIV 10.3	Aquitaine		Rouge	x	A1	x	x	x	1	x
DIV 10.4	Aquitaine		Blanc							
DIV 10.5	Aquitaine		Blanc							
DIV 10.6	Aquitaine		Blanc							
DIV 10.7	Aquitaine		Blanc	x	A2	x	x	x	3	x
DIV 10.8	Aquitaine		Blanc	x	A2	x	x	x	3	x
DIV 10.9	Aquitaine		Rouge	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 2.1	Bourgogne	2007	Rouge	x	A3	x	x	x	1	x
DIV 2.10	Bourgogne	2007	Rouge							
DIV 2.11	Bourgogne	2007	Rouge							
DIV 2.12	Bourgogne	2007	Rouge							
DIV 2.13	Bourgogne	2007	Rouge	x	A1	x	x	x	1	
DIV 2.14	Bourgogne	2008	Rouge	x	A1d	x	x	x	1	x
DIV 2.2	Bourgogne	2007	Rouge	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 2.3	Bourgogne	2007	Rouge							
DIV 2.4	Bourgogne	2007	Rouge							
DIV 2.5	Bourgogne	2007	Rouge	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 2.6	Bourgogne	2007	Rouge	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 2.7	Bourgogne	2007	Rouge	x		x	x	x	1	x
DIV 2.9	Bourgogne	2007	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 5.11	Calvados	2007	Cidre	x	B2	x	x	x	1	
DIV 5.12	Manche	2005	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.13	Mayenne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.14	Espagne	2007	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.18	Espagne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	1	
DIV 5.21	Calvados	2008	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.22	Calvados	2008	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.23	Normandie	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	1	
DIV 5.25	Calvados	2008	Cidre	x	B1	x	x	x		
DIV 5.26	Calvados	2008	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.28	Côtes d'Armor	2008	Cidre	x	B1	x	x	x		
DIV 5.30	Manche	2008	Cidre	x		x	x			
DIV 5.32	Mayenne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.34	Mayenne	2008	Cidre	x	B2		x	x	3	
DIV 5.35	Mayenne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.4	Normandie	1993	Cidre	x	B1	x	x	x		
DIV 5.46	Normandie	2008	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.47	Normandie	2008	Poiré	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.5	Normandie	1993	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.50	Normandie	2008	Poiré	x	B2	x	x	x		
DIV 5.51	Orne	2008	Cidre	x	B2	x	x			
DIV 5.52	Orne	2008	Cidre	x	B2		x	x	3	
DIV 5.59	Calvados	2004	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.60	Manche	2005	Cidre	x	B2	x	x	x	3	

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
DIV 5.69	Espagne	2008	Cidre	x	B1	x	x	x		
DIV 5.7	Calvados	1993	Cidre	x	C	x	x			
DIV 5.70	Espagne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	1	
DIV 5.71	Espagne	2008	Cidre	x	B2	x	x	x	3	
DIV 5.73	Normandie		Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 5.75	Calvados	2008	Cidre	x	B2		x	x	3	
DIV 5.76		2005	Cidre	x	B2		x	x	3	
DIV 5.9	Calvados	2005	Cidre	x	B2	x	x	x		
DIV 6.1	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	2	x
DIV 6.10	Champagne	1986	Champagne							
DIV 6.11	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	2	x
DIV 6.12	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.13	Champagne	1981	Champagne							
DIV 6.14	Champagne	1981	Champagne							
DIV 6.15	Champagne	1981	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.16	Champagne	1981	Champagne							
DIV 6.17	Champagne	1982	Champagne							
DIV 6.18	Champagne	1982	Champagne							
DIV 6.19	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.2	Champagne	2007	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.20	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.21	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.22	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.23	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.24	Champagne	1983	Champagne							
DIV 6.25	Champagne	1984	Champagne	x		x	x	x	1	x
DIV 6.26	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.27	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	3	x
DIV 6.28	Champagne	1984	Champagne	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 6.29	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	2	x
DIV 6.3	Champagne	1982	Champagne							
DIV 6.30	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.31	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	3	x
DIV 6.32	Champagne	1984	Champagne	x	A1d	x	x	x	2	x
DIV 6.33	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.34	Champagne	1985	Champagne							
DIV 6.35	Champagne	1986	Champagne	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 6.36	Champagne	1986	Champagne							
DIV 6.37	Champagne	1986	Champagne							
DIV 6.38	Champagne	1986	Champagne							
DIV 6.39	Champagne	2005	Champagne	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 6.4	Champagne	2007	Champagne	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 6.40	Champagne	2005	Champagne	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 6.41	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.42	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.43	Champagne	2005	Champagne	x	A1	x	x	x	2	x
DIV 6.44	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.45	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.46	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.47	Champagne	2005	Champagne	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 6.48	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.49	Champagne	2005	Champagne	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 6.5	Champagne	2007	Champagne	x	A1d	x	x	x	3	x
DIV 6.50	Champagne	2005	Rouge							
DIV 6.51	Champagne	2005	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
DIV 6.52	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.53	Champagne	1981	Champagne							
DIV 6.54	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.55	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.56	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.57	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.58	Champagne	2007	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.59	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.6	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.60	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.61	Champagne	2007	Champagne	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 6.62	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.63	Champagne	2007	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.64	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.65	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.66	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.67	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.68	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.69	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.7	Champagne	1981	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.71	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.72	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.74	Champagne	2007	Champagne	x		x	x	x	3	x
DIV 6.75	Champagne	2007	Champagne							
DIV 6.76	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.77	Champagne	2008	Champagne							
DIV 6.78	Champagne	2008	Champagne							
DIV 6.79	Champagne	2008	Champagne							
DIV 6.8	Champagne	1987	Champagne							
DIV 6.80	Champagne	2006	Champagne							
DIV 6.81	Champagne	2005	Champagne							
DIV 6.82	Champagne	2008	Champagne							
DIV 6.83	Champagne	1984	Champagne							
DIV 6.9	Champagne	1986	Champagne							
DIV 7.1	Champagne		Champagne	x	A1d	x	x	x	3	
DIV 7.10	Bourgogne			x	A1d	x	x	x	2	
DIV 7.103	Allemagne	1991	Blanc	x	A1	x	x	x	2	x
DIV 7.104	Allemagne	1995	Rouge	x	B1	x	x	x	3	x
DIV 7.106	Allemagne	1992	Rouge	x	B1	x	x	x	1	
DIV 7.107	Allemagne		Rouge	x	B2	x	x	x	2	
DIV 7.11	Bourgogne			x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.110	Allemagne	1982	Stone fruit	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.111	Allemagne	1982	Stone fruit							
DIV 7.113	USA	1990	Blanc	x	A1	x	x	x	2	
DIV 7.114	USA	1989	Rouge	x	B1	x	x	x		
DIV 7.117	USA									
DIV 7.118A	Bresil	1992	Blanc	x		x	x	x	2	x
DIV 7.119	Bresil	1992	Blanc	x		x	x	x	3	x
DIV 7.12	Bourgogne			x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7.121	Bresil	1992	Blanc	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.122	Italie	1992	Blanc	x	B1	x	x	x	2	
DIV 7.124	Italie	1992	Blanc	x	A1d	x	x	x	3	
DIV 7.125	Italie	1997	Lagein	x	A1a	x	x	x		x
DIV 7.128	Aquitaine	1996								
DIV 7.13	Bourgogne	1987	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
DIV 7.130	Aquitaine	1996								
DIV 7.131	Aquitaine	1996								
DIV 7.132	Aquitaine									
DIV 7.133	Aquitaine									
DIV 7.134	Aquitaine									
DIV 7.135	Aquitaine			x	B1	x	x	x	3	x
DIV 7.136	Aquitaine									
DIV 7.137	Languedoc	2000								
DIV 7.138	Languedoc	2000								
DIV 7.139	Languedoc	2000								
DIV 7.14	Bourgogne	1992	Rouge							
DIV 7.140	Languedoc	2000								
DIV 7.141	Languedoc	2000								
DIV 7.142	Languedoc	2000		x	B1	x	x	x	3	x
DIV 7.143	Languedoc	2000								
DIV 7.144	Languedoc	2000								
DIV 7.145	Languedoc	2000								
DIV 7.146	Languedoc	2004	Rouge							
DIV 7.147	Languedoc	2004	Blanc	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.148	Languedoc	2004	Blanc							
DIV 7.149	Languedoc	2004	Chardonnay							
DIV 7.15	Bourgogne	1999	Rouge							
DIV 7.150	Languedoc	2004	Merlot							
DIV 7.151	Languedoc	2004	Merlot							
DIV 7.152	Languedoc	2004	Rosé							
DIV 7.153	Languedoc	2004	Chardonnay							
DIV 7.154	Languedoc	2005	Marselan							
DIV 7.155	Rhone	2005	Rouge							
DIV 7.156	Languedoc	2005	Rouge	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.157	Languedoc	2005	Rouge							
DIV 7.158	Languedoc	2006	Rouge							
DIV 7.159	Rhone	2006	Rouge							
DIV 7.16	Bourgogne	1992	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7.160	Italie			x	B1	x	x	x	1	x
DIV 7.161	Italie									
DIV 7.162	Italie			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.163	Italie			x	A3	x	x	x	3	x
DIV 7.165	Italie			x	A1	x	x	x	3	x
DIV 7.166	Italie									
DIV 7.167	Italie			x	A1a	x	x	x	1	
DIV 7.168	Italie			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.169	Italie			x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.17	Bourgogne	1984	Blanc	x	A2	x	x	x	3	x
DIV 7.18	Aquitaine	1999		x	A1c	x	x	x	1	
DIV 7.180	Allemagne		Stone fruit	x	B1	x	x	x	2	x
DIV 7.181	Allemagne		Stone fruit	x	B2	x	x	x	2	x
DIV 7.182	Allemagne		Stone fruit	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.183	Allemagne		Stone fruit	x	B1	x	x	x	2	x
DIV 7.184	Allemagne		Stone fruit	x	B2	x	x	x	2	x
DIV 7.185	Allemagne		Stone fruit	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.186	Allemagne									
DIV 7.187	USA			x	B1	x	x	x	1	x
DIV 7.188	Allemagne		Stone fruit	x		x	x	x	2	x
DIV 7.189	Allemagne		Stone fruit	x	B2	x	x	x	2	x
DIV 7.19	Aquitaine	1999								

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
DIV 7.190	Allemagne		Stone fruit							
DIV 7.191	Allemagne		Stone fruit							
DIV 7.192	Allemagne									
DIV 7.193	Suisse			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.194	Suisse		Stone fruit							
DIV 7.195	USA									
DIV 7.196	USA			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.197	USA			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.198	Allemagne									
DIV 7.199	Allemagne									
DIV 7.2	Bourgogne			x	A1	x	x	x	1	x
DIV 7.20	Bourgogne	1999	Blanc	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.21	Bourgogne	1999	Rouge	x	A1	x	x	x	1	
DIV 7.22	Bourgogne	1992	Rouge	x	A3	x	x	x	2	x
DIV 7.23	Bourgogne	1999	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7.24	Bourgogne									
DIV 7.25	Bourgogne	2003								
DIV 7.26	Italie	1997		x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.27	Italie	1999	Rouge	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.28	Italie	1999		x		x	x	x	2	x
DIV 7.29	Italie	1999		x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.3	Bourgogne			x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7.30	Italie	1998		x	A3	x	x	x	1	x
DIV 7.31	Italie	1998	Rouge	x	B2	x	x	x	3	
DIV 7.32	Italie	1998	Rouge	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.33	Italie	1998		x	A1	x	x	x	3	x
DIV 7.35	Italie	1999		x	A1	x	x	x	3	
DIV 7.36	Italie	1999		x	A1a	x	x	x	2	
DIV 7.37	Italie	1998		x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.38	Espagne	1993	Rouge							
DIV 7.39	Espagne	1995	Rosé	x	B1	x	x	x	3	x
DIV 7.4	France			x	B1	x	x	x	2	x
DIV 7.40	Espagne	1993	Rosé	x	B2	x	x	x	3	x
DIV 7.42	Espagne	1999		x	A1a	x	x	x	1	
DIV 7.44	Espagne	1992								
DIV 7.45	Espagne	1999		x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.46	Espagne	1999		x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7.47	Espagne	1993		x	A1	x	x	x	2	x
DIV 7.48	Espagne	1993								
DIV 7.49	Espagne	1993								
DIV 7.5	France									
DIV 7.50	Espagne	1999		x		x	x	x	2	x
DIV 7.51	Portugal	1999		x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.52	Portugal	1999		x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.53	Portugal	1999								
DIV 7.54	Autriche			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.55	Autriche			x	A1a	x	x	x	1	
DIV 7.56	Autriche			x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.57	Autriche			x	A1	x	x	x	1	x
DIV 7.59	Autriche	1999		x		x	x	x	2	x
DIV 7.6	Bourgogne			x	A3	x	x	x	2	x
DIV 7.60	Autriche	1999								
DIV 7.61	Autriche			x	A3	x	x	x	3	x
DIV 7.62	Autriche			x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.63	Allemagne	1996	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
DIV 7.64	Allemagne	1989	Rouge	x	B1	x	x	x	1	x
DIV 7.65	Allemagne	1998	Chardonnay							
DIV 7.66	Allemagne	2002		x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7.67	Argentine	2000	Rouge	x	A1	x	x	x	2	x
DIV 7.68	Argentine	2000	Malbec							
DIV 7.69	Argentine	2000	Malbec							
DIV 7.7	France									
DIV 7.70	Argentine	2000	Rouge	x	B1	x	x	x	3	
DIV 7.71	Argentine	2000	Malbec							
DIV 7.72	Afrique du sud	2005		x	A1	x	x	x	1	x
DIV 7.73	Australie	2005	Rouge	x	A1b	x	x	x	3	x
DIV 7.74	Australie	2005		x	A1b	x	x	x	1	x
DIV 7.75	USA			x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7.76	USA			x	A1a	x	x	x		x
DIV 7.8	Alsace	2001								
DIV 7.9	Bourgogne			x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7A.1	France	1989	Blanc	x	A1	x	x	x	3	
DIV 7A.10	Bourgogne	1987	Blanc	x	A1d	x	x	x		x
DIV 7A.11	Languedoc	1988	Blanc	x	A1a	x	x	x	1	x
DIV 7A.12	Bourgogne	2002	Blanc	x		x	x	x	3	x
DIV 7A.13	Bourgogne	2002	Blanc							
DIV 7A.14	Bourgogne	2002	Blanc							
DIV 7A.15	Bourgogne	2002	Blanc	x	A1	x	x	x	2	x
DIV 7A.16	Bourgogne	1984	Rouge	x	A3	x	x	x	2	x
DIV 7A.17	Bourgogne	1988	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
DIV 7A.18	Bourgogne	1991	Rouge	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7A.19	Bourgogne	1992	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7A.2	Bourgogne	1992	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7A.20	Bourgogne	1999	Rouge	x	A1	x	x	x	1	x
DIV 7A.21	Bourgogne	1999	Rouge	x	A1a	x	x	x	2	x
DIV 7A.22	Bourgogne	2001	Rouge	x		x	x	x	3	x
DIV 7A.23	Bourgogne	2001	Rouge							
DIV 7A.24	Bourgogne	2001	Rouge	x	A1a	x	x	x		x
DIV 7A.25	Bourgogne	2002	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7A.26	Bourgogne	2002	Rouge							
DIV 7A.27	Bourgogne	2002	Rouge							
DIV 7A.28	Bourgogne	2002	Rouge							
DIV 7A.29	Bourgogne	2002	Rouge							
DIV 7A.3	Bourgogne	2001	Blanc	x	A1b	x	x	x		x
DIV 7A.30	Bourgogne	2002	Rouge							
DIV 7A.4	Bourgogne	2000	Blanc	x		x	x	x	2	x
DIV 7A.5	Bourgogne	1985	Blanc							
DIV 7A.6	Languedoc	2000	Blanc	x	A1	x	x	x	1	
DIV 7A.7	Bourgogne	1992	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV 7A.8	Bourgogne	1986	Blanc							
DIV 7A.9	Jura	1993	Blanc	x	A1a	x	x	x	3	x
DIV DB0	Italie									
DIV DB2	Italie			x	B1	x	x	x	3	x
DIV DBA	Italie			x	B2	x	x	x	3	x
DIV DBB	Italie			x		x	x	x	3	
ExpC	France			x	B1		x	x	3	
GR1	Grèce			x	A1a		x	x		x
GR10	Grèce			x	A1		x	x	3	
GR2	Grèce			x	A1a		x	x		
GR3	Grèce			x	A1		x	x		

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
GR4	Grèce			x	A1		x	x	3	
GR5	Grèce			x	A1		x	x	3	
GR6	Grèce			x	A1a		x	x	1	
GR7	Grèce			x	A1		x	x		
GR8	Grèce			x	A1b		x	x	1	
GR9	Grèce			x	A1		x	x	1	
IOEB 0026	Aquitaine	2000	Rouge	x	A1a		x	x		x
IOEB 0205	Champagne	2002	Champagne	x	A1		x	x		x
IOEB 0501	Centre	2005	Rouge	x	B2		x	x		x
IOEB 0502	Centre	2005	Rouge	x	B1		x	x	3	
IOEB 0503	Centre	2005	Rouge							
IOEB 0505	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 0506	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 0510	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 0511	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 0512	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 0513	Aquitaine	2005	Rouge							
IOEB 8403	Aquitaine	1984	Rouge	x	B1		x	x	2	x
IOEB 8406	Aquitaine	1984	Rouge	x	B1		x	x	3	x
IOEB 8413	Aquitaine	1984	Rouge							
IOEB 8417	Aquitaine	1984	Rouge	x	B2		x	x	3	x
IOEB 8419	Aquitaine	1984	Rouge	x	B1		x	x		x
IOEB 8802	Aquitaine	1988	Rouge	x	B2		x	x	3	x
IOEB 89001	France									
IOEB 89003	Espagne									
IOEB 89006	France									
IOEB 89007	France									
IOEB 89008	France									
IOEB 89008	France									
IOEB 89010	France									
IOEB 89011	France									
IOEB 89019	France									
IOEB 89022	France									
IOEB 89030	France									
IOEB 89031	France									
IOEB 89035	France									
IOEB 89043	France									
IOEB 89048	France									
IOEB 8905	Aquitaine	1989	Blanc	x	B2		x	x	3	x
IOEB 89050	France									
IOEB 89065	France									
IOEB 89076	France									
IOEB 8908	Aquitaine	1989	Rouge	x	B1		x	x	3	x
IOEB 89092	France									
IOEB 89095	France									
IOEB 89101	France									
IOEB 89105	France									
IOEB 89111	France									
IOEB 89127	France									
IOEB 89132	France									
IOEB 89136	France									
IOEB 89144	France									
IOEB 9115	Aquitaine	1991	Rouge	x	A1		x	x		x
IOEB 9204	Aquitaine	1992	Rouge							
IOEB 9220	Grèce	1992	Rouge	x	B2		x	x	3	x

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
IOEB 9221	Grèce	1992	Rouge	x	A1c		x	x	2	x
IOEB 9304	Normandie	1993	Cidre	x	B1		x	x	2	x
IOEB 9517	Aquitaine	1995	Vin fortifié	x	A1		x	x		x
IOEB 9523	Aquitaine	1995	Vin fortifié	x	A1		x	x	3	x
IOEB 9613	Aquitaine	1996	Blanc	x	A1c		x	x	3	x
IOEB 9614	Aquitaine	1996	Blanc	x	A1		x	x	3	x
IOEB 9624	Languedoc	1996	Blanc	x	A1a		x	x	3	x
IOEB 9628	Aquitaine	1996	Rouge							
IOEB 9701	Aquitaine	1997	Rouge	x	A1		x	x	2	x
IOEB 9801	Aquitaine	1998	Rouge							
IOEB 9803	Aquitaine	1998	Rouge	x	A3		x	x	3	x
IOEB 9804	Aquitaine	1998	Rouge							
IOEB 9805	Aquitaine	1998	Rouge	x	A1		x	x	2	x
IOEB 9807	Aquitaine	1998	Rouge							
IOEB 9808	Aquitaine	1998	Rouge							
IOEB 9902	Aquitaine	1999	Rouge	x	A3		x	x	1	
IOEB 9903	Aquitaine	1998	Rouge							
L 181	Australie			x	B2		x	x	3	x
IOEB 89021	Italie			x	B1		x	x	3	x
IOEB 89023	Italie			x	B1		x	x	3	x
MBO	Australie			x	A3		x	x	3	x
MC1	Champagne		Blanc	x	A1		x	x	3	x
PSU-1	USA	1977	Rouge	x	A1a		x	x	2	x
IOEB 89024	Espagne			x	B1		x	x	1	x
SABO 11	Afrique du sud	1998	Rouge	x	A1c	x	x	x	3	x
SABO 13	Afrique du sud		Rouge	x	A1c	x	x	x	1	x
SABO 14	Afrique du sud		Rouge							
SABO 16	Afrique du sud		Rouge	x	B2	x	x	x	3	x
SABO 17	Afrique du sud	1998	Rouge	x	B2	x	x	x	3	x
SABO 18	Afrique du sud		Rouge	x	B1	x	x	x	2	x
SABO 21	Afrique du sud		Rouge	x	B2	x	x	x	2	x
SABO 22	Afrique du sud		Rouge	x	B2	x	x	x	3	
SABO 23	Afrique du sud		Rouge	x	A1c	x	x	x		x
SABO 24	Afrique du sud		Rouge	x	A1a	x	x	x		x
SABO 26	Afrique du sud		Rouge	x	B1	x	x	x	3	x
SABO 29	Afrique du sud	1998	Rouge							
SABO 30	Afrique du sud		Rouge	x	A1c	x	x	x	2	x
SABO 31	Afrique du sud		Rouge	x	A1c	x	x	x	2	x
SABO 32	Afrique du sud		Rouge	x	A1a	x	x	x	3	
SABO 33	Afrique du sud		Rouge							
SABO 34	Afrique du sud			x	A1b	x	x	x	2	x
SABO 35	Afrique du sud		Rouge							
SABO 37	Afrique du sud		Rouge							
SABO 38	Afrique du sud									
SABO 39	Afrique du sud		Rouge							
SABO 40	Afrique du sud		Rouge	x	A1	x	x	x	1	
SABO 41	Afrique du sud		Rouge	x	A1	x	x	x	1	x
SABO 42	Afrique du sud	2002								
SABO 50	Afrique du sud			x	A1a	x	x	x	2	x
SABO 53	Afrique du sud		Rouge	x	B2	x	x	x	3	x
SABO 54	Afrique du sud	2000	Blanc	x	A1c	x	x	x		x
SABO 55	Afrique du sud	2000	Blanc	x	A1c	x	x	x	1	x
SABO 56	Afrique du sud		Rouge	x	A1c	x	x	x	3	
SABO 57	Afrique du sud			x	A1c	x	x	x	3	x
SABO 58	Afrique du sud									

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
SABO 59	Afrique du sud									
SARCO-IOEB 1491	Aquitaine	2001	Rouge	x	A1		x	x	1	
SARCO-IOEB 241	Champagne	2002	Champagne							
SARCO-IOEB 277	Aquitaine	2001	Rouge	x	A1		x	x	3	x
SARCO-IOEB 384	Savoie	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 384	Savoie	2002	Blanc	x	A1a		x	x	1	x
SARCO-IOEB 386	Aquitaine	2002	Rouge							
SARCO-IOEB 388	Aquitaine	2002	Rouge							
SARCO-IOEB 390	Bourgogne	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 393	Bourgogne	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 401	Aquitaine	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 411	France	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 419	Aquitaine	2002	Rouge							
SARCO-IOEB 421	Jura	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 422	Jura	2003	Blanc	x	A1d		x	x	3	x
SARCO-IOEB 425	Jura	2002	Blanc							
SARCO-IOEB 436a	Aquitaine	2003	Rouge	x	A1b		x	x	1	x
SARCO-IOEB 438	Aquitaine	2003	Rouge	x	A1		x	x	3	x
SARCO-IOEB 444	Aquitaine	1996	Blanc	x	A1d		x	x	3	x
SARCO-IOEB 450	Bourgogne			x	A1a		x	x	3	x
SARCO-IOEB 7	Aquitaine	2001	Rosé							
V10-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	3	
V10-2	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	2	x
V10-3	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V10-4	Chili	2008	Rouge							
V11-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	
V11-2	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	2	x
V11-3	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x		x
V11-4	Chili	2008	Rouge							
V12-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V12-2	Chili	2008	Rouge							
V12-3	Chili	2008	Rouge							
V12-4	Chili	2008	Rouge							
V13-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x		x
V13-2	Chili	2008	Rouge							
V13-3	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V13-4	Chili	2008	Rouge							
V14-1	Chili	2008	Rouge							
V14-3	Chili	2008	Rouge							
V14-4	Chili	2008	Rouge							
V15-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V15-2	Chili	2008	Rouge							
V15-3	Chili	2008	Rouge							
V15-4	Chili	2008	Rouge							
V16-1	Chili	2008	Rouge							
V16-2	Chili	2008	Rouge							
V16-3	Chili	2008	Rouge							
V17-1	Chili	2008	Rouge							
V17-2	Chili	2008	Rouge							
V17-3	Chili	2008	Rouge							
V17-4	Chili	2008	Rouge							
V18-1	Chili	2008	Rouge							
V18-2	Chili	2008	Rouge							
V18-3	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V18-4	Chili	2008	Rouge							

Nom de la souche	Origine géographique	Année	Type de produit	Souches génétique	MLST	Marqueurs			Physiologie	Sucres
						S1	S2	S3		
V4-1	Chili	2008	Rouge	x	A1a	x	x	x		x
V4-2	Chili	2008	Rouge	x	A1a	x	x	x	3	x
V4-3	Chili	2008	Rouge							
V4-4	Chili	2008	Rouge	x	A1a	x	x	x	1	x
V5-1	Chili	2008	Rouge							
V5-2	Chili	2008	Rouge	x	A1a	x	x	x		
V5-3	Chili	2008	Rouge							
V5-4	Chili	2008	Rouge	x	A1a	x	x	x		x
V9-1	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	2	x
V9-2	Chili	2008	Rouge	x	A1b	x	x	x	1	x
V9-3	Chili	2008	Rouge							
V9-4	Chili	2008	Rouge							
VF	Bourgogne			x	A1		x	x	3	
VO	Espagne	1989		x	A1a		x	x	3	
VP 41	Italie			x	A3		x	x		

INDEX : Liste des souches d'*O. oeni* utilisées durant cette étude. Les 510 souches typées en REA-PFGE ont été insérées, avec pour chacune d'elles (lorsque l'information était connue), leur origine géographique, le produit duquel elles ont été isolées, et l'année d'isolation.

Souches génétique : sélection des 282 souches retenues pour l'approche MLST. Les souches sélectionnées ont été annotées par un x

MLST : l'appartenance des souches aux groupes phylogénétiques, par MLST, a été annotée, quand les souches correspondantes présentaient des résultats complets

Marqueurs : liste des souches retenues pour l'approche de génotypage par étude de présence de marqueurs. Les colonnes S1, S2 et S3 représentent les trois séries de marqueurs analysés, et dont les résultats ont été mis respectivement dans les paragraphes 1.7.1, 1.7.2, et 1.7.3 de la section résultats.

Physiologie : liste des souches pour lesquelles des résultats complets ont été obtenus dans l'étude de phénotypage de l'espèce bactérienne.

Sucres : liste des souches pour lesquelles des résultats complets ont été obtenus dans l'étude de la dégradation des souches par les souches de la collection.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles

Bridier J., O. Claisse, M. Coton, E. Coton, et A. Lonvaud-Funel. 2010. Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. Applied and Environmental Microbiology 76:7754-7764.

Bridier J., Claisse O., David V., Coton M., Miot-Sertier C., Alexandre H., Coton E., Gibon Y., Lonvaud-Funel A. The diversity of *Oenococcus oeni*. Oeno2011, Dunod.

Goulielmakis A., Bridier J., Barre A. Claisse O., Sherman D. Durrens P., Lonvaud-Funel A., Bon E. How does *Oenococcus oeni* adapt to its environment ? A pangenomic oligonucleotide microarray for analysis *O. oeni* gene expression under wine shock. Oeno2011, Dunod.

Communications orales

Bridier J., Claisse O., Coton M., Desmarais C., Miot-Sertier C., Coton E., Lonvaud-Funel A. Analyse de la diversité génétique des bactéries lactiques de l'espèce *Oenococcus oeni*. Congrès de la Société Française de Microbiologie, Marseille, 2010.

Bridier J., Claisse O., Coton M., Desmarais C., Miot-Sertier C., Coton E., Lonvaud-Funel A. Diversité intraspécifique génétique et phénotypique de l'espèce *Oenococcus oeni*, 11^{ème} Journée scientifique de l'Ecole doctorale science de la vie et de la santé, Arcachon, 2011.

Bridier J., Claisse O., David V., Coton M., Miot-Sertier C., Alexandre H., Coton E., Gibon Y., Lonvaud-Funel A. The diversity of *Oenococcus oeni*. Symposium international d'œnologie, Bordeaux, 2011.

Communications affichées

Bridier J., Claisse O., Lonvaud-Funel A. Existence de populations génétiques chez l'espèce *Oenococcus oeni*. 10^{ème} Journée scientifique de l'Ecole doctorale science de la vie et de la santé, Arcachon, 2010.

Bridier J., Claisse O., Coton M., Desmarais C., Miot-Sertier C., Coton E., Lonvaud-Funel A. Diversité interspécifique chez *Oenococcus oeni*. 5^{èmes} Journées des Microbiologistes de l'INRA, Futuroscope, 2010.

Bridier J., Claisse O., Coton M., Coton E., Lonvaud-Funel A., Biodiversité intraspécifique chez *Oenococcus oeni*. 2^{ème} Journée scientifique de l'ISVV, Villenave d'Ornon, 2010.

Bridier J., Claisse O., Coton M., Desmarais C., Miot-Sertier C., David V., Alexandre H., Coton E., Lonvaud-Funel A. Diversité génétique intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*. 17^{ème} Colloque du club des bactéries lactiques, Nancy 2010.

Goulielmakis A., Bridier J., Barre A. Claisse O., Sherman D. Durrens P., Lonvaud-Funel A., Bon E. How does *Oenococcus oeni* adapt to its environment ? A pangenomic oligonucleotide microarray for analysis *O. oeni* gene expression under wine shock. Symposium international d'œnologie, Bordeaux, 2011.

Résumé en français

Oenococcus oeni est l'agent principalement responsable de la fermentation malolactique durant la vinification. Son adaptation au milieu vin est une étape clé dans la réussite de la FML, et donc dans la qualité des vins finis. Cependant, au sein de l'espèce, il existe une variabilité phénotypique importante, et de nombreuses souches ne sont ainsi pas aptes à réaliser la FML. La sélection des meilleures souches œnologiques passe ainsi par l'analyse de la diversité d'*O. oeni*. Cette étude a été abordée dans cette thèse, selon trois grands axes de recherche. Premièrement, la diversité génétique a été étudiée par des approches MLST, REA-PFGE et présence de marqueurs, et a montré une structuration de l'espèce en deux groupes phylogénétiques et plusieurs sous-groupes, reliés à des souches d'origine géographique précise. Ensuite, l'étude de la diversité phénotypique a montré la grande variabilité d'adaptation au vin des souches étudiées et un meilleur comportement de celles du groupe phylogénétique A durant la vinification. Enfin, une étude transcriptomique a mis en lumière certains mécanismes moléculaires éventuellement impliqués dans la réponse au stress vin chez *O. oeni*.

Mots clés : MLST, *Oenococcus oeni*, diversité, adaptation au stress, transcriptomique

Résumé en anglais

Oenococcus oeni is the main agent responsible for the malolactic fermentation, during the wine making process. Its adaptation to wine environment is a key step for the success of the MLF, and then for wines quality. However, there is a high phenotypic variability among the species and several strains are unable to perform MLF. The selection of the best enological strains implies starting by analyzing the diversity of *O. oeni*. This study has been divided in three main themes of research. Firstly, the genetic diversity has been analyzed using several approaches, MLST, REA-PFGE and presence of genetic markers. That study proved the structuration of the species in two phylogenetic groups and several subgroups, related to geographical areas. Secondly, the study of the phenotypic diversity showed that all the studied strains present a high variability and the best behavior in wine making conditions is found in those from the phylogenetic group A. Finally, a transcriptional analysis has revealed some molecular mechanisms possibly implicated in stress response in *O. oeni*

Keywords : MLST, *Oenococcus oeni*, diversity, stress adaptation, transcriptomic

