

Grand Prix Sciences & Recherche 2024

Camille EICHER

Évolution adaptative
et acido-tolérance de la bactérie
d'intérêt œnologique
Oenococcus oeni

PRÉFACE

L'Académie Amorim est née, au début des années 90, d'une volonté des grands noms de l'œnologie de promouvoir leur discipline, leurs recherches, l'excellence des travaux conduits par leurs étudiants, en créant un concours scientifique international. Le groupe Amorim a immédiatement répondu à leur appel.

Contribuer à une meilleure connaissance du vin et de son environnement, tel était l'objectif poursuivi par ces passionnés, bientôt rejoints par leurs confrères universitaires, journalistes, artistes, juristes, économistes, tous animés par cette même passion.

Aujourd'hui, Jacques Puisais, Président-fondateur de l'Académie Amorim, nous a quitté. Tout comme Robert Tinlot, ancien directeur général de l'OIV, qui lui avait succédé à la présidence de notre institution avec talent. Et il en fallait pour donner un deuxième souffle à cette Académie et l'ouvrir sur l'économie, les marchés, le juridique, l'environnement... autant de disciplines indissociables du monde viti-vinicole, autant de sujets dont Jean-Marie Aurand s'est emparé avec enthousiasme en succédant à ses illustres prédécesseurs.

La modeste contribution du bouchon de liège, fleuron de l'activité du groupe Amorim, a été d'initier, de soutenir et promouvoir ce concours international visant à récompenser les travaux de jeunes chercheurs en œnologie et en sciences humaines dans le domaine du vin.

Cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix Sciences & Recherche de l'Académie Amorim, est devenue, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin. Je ne peux que souhaiter la voir poursuivre dans la voie de l'excellence qu'elle s'est tracée durant ces dernières décades.

Antonio Rios de Amorim

Président directeur général Corticeira Amorim

Vice-Président de l'Académie Amorim

ÉDITO

Comment mieux maîtriser la fermentation malolactique par *Oenococcus oeni* ?

Voilà une question cruciale à laquelle répond avec clarté la thèse de Camille Eicher, offrant ainsi aux professionnels une meilleure appréhension de cette étape si sensible pour l'assouplissement et la stabilisation des vins.

La méthodologie mise en œuvre repose sur la production de mutants identifiés par séquençage du génome. Elle permet d'évaluer si le locus citrate est affecté pour les différents individus et de mieux jauger le métabolisme de l'acide citrique.

Les résultats montrent que l'hypothèse du lien entre la consommation de citrate et l'acido-tolérance se vérifie et le métabolisme du citrate a été approfondi.

Les membres de l'Académie Amorim ont salué l'excellent niveau scientifique des travaux de Camille Eicher et en attendent déjà la suite qui permettra de mesurer si le locus du malate peut aussi évoluer.

Prometteuse et talentueuse, la lauréate 2024 du Grand Prix scientifique de l'Académie Amorim ouvre ainsi la voie à de nouvelles recherches très attendues.

Jean-Marie Aurand
Président de l'Académie Amorim

Évolution adaptative et acido-tolérance de la bactérie d'intérêt œnologique *Oenococcus oeni*

Camille Eicher

Thèse soutenue le 11 avril 2024
obtenue avec les félicitations du Jury
ainsi que la mention « Cum Laude », plus haute mention
décernée par l'université « Rovira i Virgili »

Directeur de thèse :

Dr. Cosette Grandvalet

Co-directeur de thèse :

Pr. Cristina Reguant Miranda

Membres du Jury :

Pr. Giuseppe Spano

Pr. Sergi Ferrer

Pr. Nicolas Rozès

Pr. Fabienne Remize

Pr. Raphaëlle Tourdot-Maréchal

Dr. Joana Coulon

Dr. Marion Favier

1 - INTRODUCTION

Le raisin, fruit provenant de la vigne *Vitis vinifera*, est l'un des fruits les plus cultivés au monde, principalement pour la production de vin (258 millions d'hectolitres produits en 2022, selon l'organisation internationale de la vigne et du vin (OIV)). Le vin est une boisson fermentée obtenue à l'issue d'un processus de vinification dont les principales étapes (égrappage, pressurage, macération fermentation) diffèrent en fonction du type de vin à élaborer (vin rouge, vin blanc, rosé).

Au cours de la vinification, deux étapes de fermentation peuvent se succéder. La première est la fermentation alcoolique, réalisée par les levures (principalement *Saccharomyces cerevisiae*) qui transforment les sucres du moût de raisin en éthanol et dioxyde de carbone (CO₂). Une deuxième fermentation, que l'on appelle fermentation malolactique, peut ensuite se produire. Cette fermentation n'est pas souhaitée pour tous les types de vin, seuls les vins rouges et certains vins blancs (comme les vins de Champagne) sont concernés. Les bactéries lactiques, bactéries souvent associées aux produits fermentés, sont à l'origine de cette fermentation. Elles induisent la transformation de l'acide malique, un acide organique retrouvé à une concentration comprise entre 1 et 5 g/L dans les vins, en acide lactique et CO₂ (Lerm et al., 2010; Ruffner et al., 1984). Ce catabolisme permet la diminution de l'acidité totale, d'apporter rondeur, souplesse et stabilité microbiologique aux vins concernés.

Ces deux fermentations peuvent se produire spontanément (c.-à-d. sans intervention humaine), puisque les microorganismes naturellement présents sur la baie de raisin et l'environnement *viti-vinivole* peuvent initier cette bioconversion. Néanmoins, les fermentations spontanées étant peu prévisibles et difficiles à contrôler, beaucoup de vinificateurs ensemencent par précaution leurs vins à partir de souches commerciales vendues sous forme lyophilisée que l'on appelle « starters » (Maicas et al., 2000 ; Nielsen et al., 1996). Au total, une trentaine d'espèces de bactéries lactiques peuvent être retrouvées en vin (König and Fröhlich, 2017). À ce jour, la principale bactérie lactique utilisée pour la conduite de la fermentation malolactique est *Oenococcus oeni*.

Du point de vue microbiologique, *O. oeni* est un coque à Gram positif, non mobile, ne produisant pas de spores, anaérobie facultatif, formant de longues chaînettes. Elle est qualifiée comme étant acido-tolérante et est capable de croître dans un milieu

contenant 10 % d'éthanol (v/v) (Dicks et al., 1995 ; Garvie, 1967). Cette bactérie est retrouvée dans le vin, le cidre et le kombucha, mais pourrait être présente dans d'autres boissons fermentées (Lorentzen and Lucas, 2019). Ainsi, les différentes souches qui composent l'espèce *O. oeni* sont regroupées en 4 phylogroupes génétiques : le groupe A comprend uniquement des souches isolées de vin, les groupes B et C comprennent des souches isolées de vin, mais aussi de cidres, et enfin le groupe D qui ne contient que des souches provenant de kombucha (Lorentzen et al., 2019). C'est l'espèce phare pour la conduite de la fermentation malolactique en vin puisqu'elle est plus résistante aux nombreux stress associés au vin comparé aux autres bactéries lactiques.

Le vin est un environnement qui regroupe plusieurs facteurs de stress qui peuvent affecter le développement de cette bactérie. En effet, c'est un milieu pauvre en nutriments, contenant de l'éthanol issu du métabolisme des levures, au pH faible et qui peut contenir des sulfites (SO₂), un composé chimique ajouté par le vinificateur pour la stabilisation microbiologique des vins, mais qui peut également être produit par les levures (Bauer and Dicks, 2004; Bech-Terkilsen et al., 2020). Le pH des vins, souvent très faible (2,9 – 3,8), entraîne une diminution du pH intracellulaire des microorganismes, impactant toute la physiologie de la cellule. En effet, la baisse du pH interne provoque entre autres la dénaturation des protéines, qui perdent ainsi leur activité et affectent toute la machinerie cellulaire. La baisse de pH peut également entraîner des dommages à l'ADN (Lindahl and Nyberg, 1972; van de Guchte et al., 2002). Néanmoins, *O. oeni* possède de nombreux mécanismes cellulaires lui permettant de résister au stress acide, comme par exemple la synthèse de Heat Shock Proteins (HSP) lui permettant de prévenir l'agrégation de protéines dénaturées et leur repliement (Bellanger et al., 2023; Darsonval et al., 2018; Grandvalet, 2011; Maitre et al., 2012; Sugimoto et al., 2008). Elle est également capable d'utiliser certains substrats présents dans le vin afin d'assurer sa survie et de produire de l'énergie. Le métabolisme de l'acide malique fait partie de ces mécanismes. Il est métabolisé par la bactérie par différentes enzymes, la principale étant l'enzyme malolactique qui convertit l'acide malique en acide lactique et CO₂, principale réaction recherchée lors de la fermentation malolactique (Lonvaud-Funel, 2015). Ce métabolisme permet l'activation de la force proton motrice dans la cellule, qui constitue une source d'énergie pour les bactéries (Loubiere et al., 1992; Poolman et al., 1991; Salema et al., 1996). Elle entraîne également la consommation d'un proton, augmentant ainsi le pH intracellulaire permettant de pallier aux effets liés au stress acide.

O. oeni peut également métaboliser l'acide citrique, un autre acide organique présent en quantité restreinte dans le vin (0,13 à 0,90 g/L) (Alexandre et al., 2008; Eicher et al., 2024a). Son métabolisme est à l'origine de la production d'un composé aromatique appelé diacétyle. Sa synthèse apporte des notes beurrées au vin qui ne sont désirées qu'en très faibles quantités, puisqu'elles deviennent désagréables au-delà d'un certain seuil (Bartowsky and Henschke, 2004; Fornachon and Lloyd, 1965; Mink et al., 2014). Ainsi, l'activité de *O. oeni* impacte non seulement l'acidité, mais également le goût et le profil aromatique des vins (Agree and Henick-Kling, 1998; Sauvageot and Vivier, 1997; Versari et al., 1999; Vivas et al., 1997). Tout comme le métabolisme de l'acide malique, la dégradation du citrate active la force proton motrice et permet la consommation de protons dans la cellule (Eicher et al., 2024a; Ramos et al., 1994). De plus, le co-métabolisme du citrate avec le glucose semble avoir un effet synergique sur la croissance des bactéries lactiques (Kang et al., 2013;

Ramos and Santos, 1996; Salou et al., 1994). Chez *O. oeni*, le métabolisme du citrate fait intervenir trois protéines (1) : (i) une perméase pour l'internalisation de l'acide organique dans la cellule, codée par le gène *maeP* ; une citrate lyase, dont les sous-unités sont codées par plusieurs gènes (*citC, D, E, F, X et G*), qui catalyse la conversion du citrate en acétate (relargué dans le milieu extracellulaire) et oxaloacétate ; (iii) une oxaloacétate décarboxylase, codée par le gène *mae*, qui convertit l'oxaloacétate en pyruvate. Ce dernier est ensuite réorienté à travers différentes voies métaboliques, et peut notamment servir à la production du diacétyle. L'ensemble de ces gènes forment un opéron : l'opéron citrate. Cet opéron inclut également le gène *citR*, dont la fonction était jusqu'à présent inconnue (Figure 1).

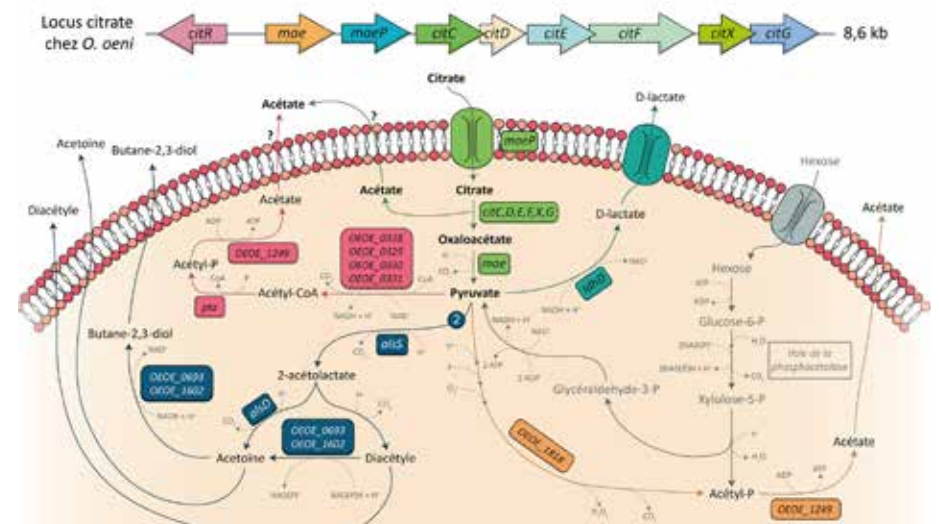


Figure 1 : Métabolisme du citrate et devenir du pyruvate chez *O. oeni*.

Le métabolisme du citrate ainsi que l'organisation du locus citrate chez *O. oeni* sont représentés. Le pyruvate produit par le catabolisme du citrate (partie verte) peut être métabolisé en D-lactate (voie bleue) ou conduire à la production d'acétate par la voie de la pyruvate déshydrogénase (représentée en rose) ou par la voie de la pyruvate oxydase (représentée en orange). Enfin, deux molécules de pyruvate (symbolisées par le chiffre 2 sur la figure) peuvent être métabolisées en α -acéto lactate sous l'action de l'acéto lactate synthase (voie bleu foncé), ce qui conduit à la production de diacétyle, d'acétoïne et de butane-2,3-diol. Les gènes codant pour les différentes enzymes sont indiqués. Lorsqu'aucun nom n'a été attribué à un gène, le locus tag du gène est indiqué (souche PSU-1). Le transporteur de l'acétate n'ayant pas été identifié chez *O. oeni*, des points d'interrogation ont été indiqués.

Bien que le métabolisme du citrate ait un grand nombre d'effets bénéfiques sur la physiologie des bactéries lactiques, il a été démontré que celui-ci pouvait avoir un effet délétère sur la résistance au stress acide chez *O. oeni*. En effet, lorsque la souche ATCC BAA-1163 est cultivée à bas pH, sa croissance est inhibée par la présence de citrate (Augagneur et al., 2007). Ceci pose question quant à l'impact de la présence de cet acide organique dans les vins très acides qui pourrait négativement impacter le déroulement de la fermentation malolactique.

Lorsque l'acidité des vins est trop importante, elle peut compromettre le développement des bactéries lactiques d'intérêt œnologique, entraînant alors une fermentation languissante voire un arrêt de fermentation. La conduite de cette fermentation reste donc un point critique de l'itinéraire de vinification qui requiert la plus grande attention, et la sélection de nouvelles souches plus résistantes au stress est une solution qui pourrait permettre d'assurer la fermentation même dans les conditions les plus difficiles. Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes de résistance au stress acide mis en place par les bactéries pourrait permettre d'optimiser les conditions de fermentation ou d'orienter la sélection de bactéries vers les plus résistantes et les plus performantes en fonction du génotype. Pour répondre à ces besoins, l'évolution expérimentale s'avère être un bon outil pouvant être appliqué à *O. oeni*.

L'évolution expérimentale est une technique inspirée des travaux de Charles Darwin sur la théorie de l'évolution (Darwin, 1831). Appliquée aux microorganismes, elle consiste à propager une ou plusieurs populations d'une espèce dans des conditions bien définies pendant des centaines ou des milliers de générations. Une pression de sélection est alors exercée sur les microorganismes, qui peut être par exemple la modulation de paramètres physico-chimiques (température, pH), (Bennett et al., 1990; Harden et al., 2015). Ainsi, les individus les plus adaptés sont ceux qui survivent et produisent une descendance.

Au cours de l'évolution, les microorganismes subissent des mutations génétiques qui peuvent impacter l'expression d'un ou de plusieurs gènes. Ces mutations sont de différents types (substitution, insertion, délétion...) et peuvent avoir un effet bénéfique, neutre ou délétère sur le phénotype de l'individu. Dans les expériences d'évolution expérimentale, les mutations bénéfiques sont favorisées au détriment des mutations délétères qui sont généralement éliminées par la sélection naturelle. Les mutations apparues dans le génome des populations évoluées sont identifiées grâce au séquençage haut débit (whole-genome sequencing ou WGS) qui permet ainsi d'identifier des gènes clés impliqués dans la réponse aux stress.

L'évolution expérimentale a plusieurs finalités : l'étude de certaines théories sur la biologie de l'évolution, la compréhension des mécanismes mis en place par un organisme pour s'adapter et coloniser une niche écologique particulière ou, d'un point de vue plus appliqué, afin obtenir des souches plus performantes pour des applications industrielles. Les paramètres de l'évolution doivent être minutieusement choisis au préalable (système de culture, taille de la population, nombre de populations perpétuées en parallèle, pression de sélection à appliquer...) puisqu'ils peuvent grandement influencer le chemin évolutif que va prendre la population microbienne au cours du processus.

2 OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'utilisation du processus d'évolution expérimentale sur *O. oeni* semble être un choix judicieux, et a d'ailleurs été d'ores et déjà appliquée deux fois à cette bactérie par une équipe de chercheurs australiens (Betteridge et al., 2017; Jiang et al., 2018). En effet, elle pourrait permettre d'obtenir des bactéries plus résistantes et plus performantes permettant de garantir la fermentation en toute circonstance. Les bactéries issues d'expérience d'évolution ne sont pas considérées comme des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM), car aucun outil ni technique de modification ne sont utilisés. Ces souches pourraient donc être utilisées en tant que ferments malolactiques. L'intérêt d'appliquer cette technique à *O. oeni* est que cette bactérie est considérée comme une bactérie hypermutable du fait de l'absence dans son génome des gènes *mutS* et *mutL*, qui sont deux gènes codant des enzymes clés dans le système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (mismatch repair = MMR). Ainsi, le taux d'apparition de mutations chez cette bactérie est 100 à 1000 fois plus important que chez d'autres espèces, facilitant l'adaptation à l'environnement imposée par l'évolution (Marcobal et al., 2008).

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) dans l'équipe Aliment, Fermentation, Interaction, Microbiote (AFIM) hébergée par l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) à Dijon. La longue expérience d'évolution expérimentale a été réalisée par Frédérique Julliat qui a soutenu son doctorat avant mon arrivée au laboratoire (Julliat, 2020). La souche ATCC BAA-1163, particulièrement bien caractérisée par notre équipe, a été choisie pour cette expérience d'évolution. En effet, ce choix a été motivé par le fait que de nombreuses connaissances sur la réponse au stress de cette souche ont été publiées (Chu-Ky et al., 2005; Darsonval et al., 2018, 2016, 2015; Grandvalet et al., 2008, 2005; Tourdot-Maréchal et al., 2000, 1999) ainsi que de par la séquence de son génome qui est entièrement annoté. L'évolution expérimentale a consisté à perpétuer cette souche pendant 20 mois (représentant 560 générations) en milieu FT80m (Cavin et al., 1989). Ce milieu permet une croissance suffisante de la bactérie. De plus, l'utilisation du FT80m pour cette expérience contribue à limiter l'apparition de mutations liées à l'adaptation au milieu de culture puisqu'il est utilisé depuis de nombreuses années pour la culture de cette bactérie au laboratoire. Six populations issues de six clones différents ont été divisées en deux séries : une série contrôle qui a été propagée à pH constant (5,3) et une deuxième série « évoluée » qui a été propagée en FT80m dont le pH a été progressivement diminué, passant de 5,3 à 2,9, l'objectif étant de sélectionner des bactéries plus résistantes à l'acidité. Ce paramètre physico-chimique a été choisi pour répondre à une problématique de terrain, car l'acidité constitue l'un des principaux facteurs limitants pouvant entraîner une fermentation languissante voire un arrêt de fermentation lors du procédé de vinification.

À l'issue de l'évolution, le génome des populations évoluées (nommées A46FJ, B47FJ, C48FJ, D49FJ, E50FJ et F51FJ) et celui de deux populations contrôles (nommées A43FJ et B44FJ) a été séquençé démontrant la présence, chez les populations évoluées uniquement, de mutations fixées (c.-à-d. présentes chez tous les individus de la population) dans 5 gènes différents, incluant le gène *mae* qui code l'oxaloacétate décarboxylase impliquée dans le métabolisme du citrate (1). Au regard de l'apparition de mutations dans ce locus citrate après cette expérience d'évolution

adaptative et compte tenu des résultats obtenus par Augagneur et al. (2007) qui a montré que l'ajout de citrate dans le milieu de culture pouvait inhiber la croissance de la bactérie (cf. introduction), un intérêt particulier a été porté sur le gène *mae*. L'un des objectifs de ma thèse a donc été de comprendre comment le métabolisme du citrate pouvait influencer sur l'acido-tolérance de *O. oeni*. Une première partie de ce travail de thèse a donc consisté à évaluer l'impact des mutations portées par les populations évoluées de la souche ATCC BAA-1163 sur leur consommation de citrate et sur le profil d'expression des gènes de l'opéron *cit* (PARTIE 3 I). Les résultats de ces travaux nous ont amenés à caractériser le rôle de *CitR*, dont la fonction était jusqu'à présent inconnue (PARTIE 3 II). Enfin, la comparaison du métabolisme du citrate de souches de *O. oeni* d'origines différentes a été effectuée et mise en relation avec d'autres voies métaboliques (métabolisme des sucres, du malate) et leur acido-tolérance (PARTIE 3 III).

Une seconde évolution expérimentale a été réalisée au cours de cette thèse sur une souche commerciale de *O. oeni* connue pour sa capacité à mener la fermentation malolactique dans une grande variété de vins, mais dont les capacités deviennent limitées lorsque le pH diminue. Comme pour l'expérience effectuée sur la souche ATCC BAA-1163, cette évolution avait pour objectif d'obtenir une souche plus tolérante à l'acidité afin d'être utilisée en vinification dans le futur et, dans une perspective plus fondamentale, de mettre en lumière les mécanismes clés impliqués dans la tolérance à l'acidité de *O. oeni*. Ces travaux font aujourd'hui l'objet d'un dépôt d'invention et ne pourront donc pas être présentés dans ce manuscrit. Ce dépôt d'invention est le point de départ de nouveaux travaux de recherche appliquée avec pour objectif la commercialisation d'une nouvelle souche pour l'industrie.

3 RÉSULTATS

3.1 Impact des mutations portées dans le locus *cit* sur l'acido-tolérance des populations évoluées (Julliat et al., 2023, Eicher et al, submitted)

Suite à l'expérience d'évolution expérimentale sur la souche ATCC BAA-1163 pour obtenir des souches de *O. oeni* plus acido-tolérantes, un séquençage du génome des populations obtenues a été réalisé et a montré l'apparition de mutations fixées dans cinq gènes différents, incluant le locus citrate. Une mesure de l'acido-tolérance des populations évoluées a été réalisée en milieu FT80m ajusté à pH 3 et supplémenté avec 3 g/L de citrate (Figure 2). Cette concentration de citrate a été choisie afin de pouvoir comparer avec les résultats précédemment obtenus par Augagneur et al. (2007). L'expérience a été réalisée sur un clone unique isolé de chacune des populations évoluées A46FJ, C48FJ, E50FJ et F51FJ (nommés clones cA46FJ, cC48FJ, cE50FJ, cF51FJ), afin de s'affranchir de la variabilité génétique pouvant exister entre les individus d'une population. Les résultats présentés ici sont ceux de quatre des six populations évoluées obtenues, mais des données similaires ont été obtenues avec les deux autres populations (B47FJ et D49FJ) (Julliat et al., 2023).

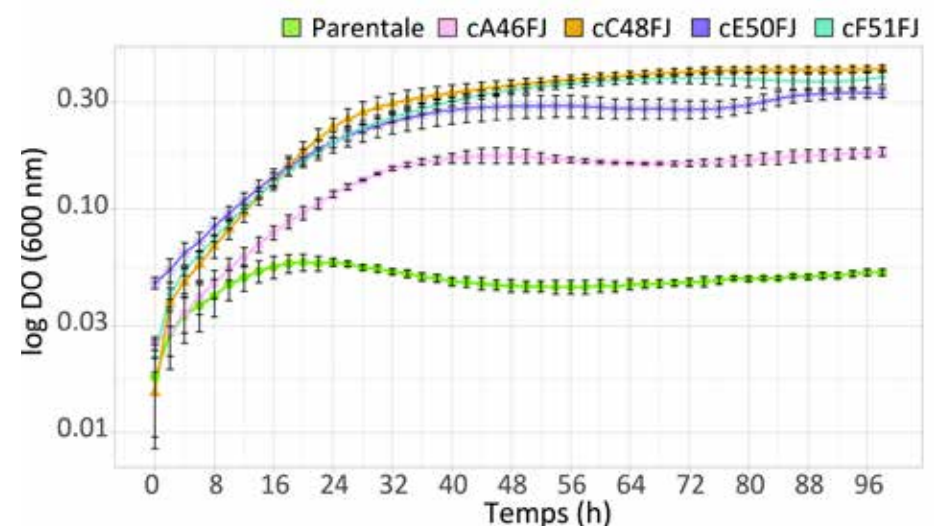


Figure 2 : Croissance à bas pH des clones issus de l'évolution expérimentale de la souche ATCC BAA-1163.

La croissance de la souche ATCC BAA-1163 (parentale) est comparée à celle des clones issus de son évolution (cA46FJ, cC48FJ, cE50FJ, cF51FJ) en FT80m à pH 3. Ces résultats ont été obtenus à partir de triplicats biologiques (n=3). Les différences significatives sont basées sur le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

La souche parentale présente une croissance limitée dans ces conditions, ce qui est en cohérence avec les travaux de Augagneur et al. (2007). Au contraire, les clones évolués montrent une meilleure capacité à se développer dans les mêmes conditions, atteignant une DO600 nm maximale située entre 0,2 et 0,4 en fonction de la souche. Parmi les clones évolués, cA46FJ présente une moindre capacité à se développer (DO maximale = 0,181), alors que cC48FJ présente les meilleurs paramètres de croissance (DO maximale = 0,425).

Les six populations évoluées sont affectées par des mutations dans le locus *cit* (Figure 3A) : (i) soit dans la zone intergénique entre *citR* et *mae*, c'est le cas des populations B47FJ, C48FJ, E50FJ et F51FJ, possédant des mutations sur la séquence -10

du potentiel promoteur de l'opéron (C48FJ) ou sur le site de fixation du ribosome (ribosome binding site ou RBS) en amont du gène *mae* (B47FJ, E50FJ, F51FJ) ; (ii) soit dans la phase codante du gène *mae*, c'est le cas de la population A46FJ, qui porte une mutation non-sens entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré ; (iii) soit une large délétion de plus de 3 kb comprenant le gène *citR* et une partie du gène *mae*, c'est le cas de la population D49FJ. Afin d'évaluer l'impact de ces mutations sur le métabolisme du citrate, la consommation de cet acide organique par les populations évoluées a été suivie au cours de la croissance et comparée à la souche parentale (Figure 3B et C). En parallèle, une extraction d'ARN a été réalisée après 24 heures de croissance pour quantifier l'expression des gènes de l'opéron par RT-qPCR chez ces différentes souches (Figure 3D). Ces deux expériences ont été réalisées en milieu GEMO (Growth effective medium for *O. oeni*) (Julliat et al., 2023). Ce milieu a été conçu afin d'optimiser la croissance des bactéries tout en se rapprochant plus des conditions œnologiques que le FT80m (présence de jus de raisin apportant des vitamines essentielles au métabolisme comme l'acide pantothénique et de citrate à une concentration de 0,3 g/L, concentration fréquemment retrouvée dans les vins). Le pH a été ajusté à 4,8 dans un premier temps, un pH optimal pour la croissance des bactéries.

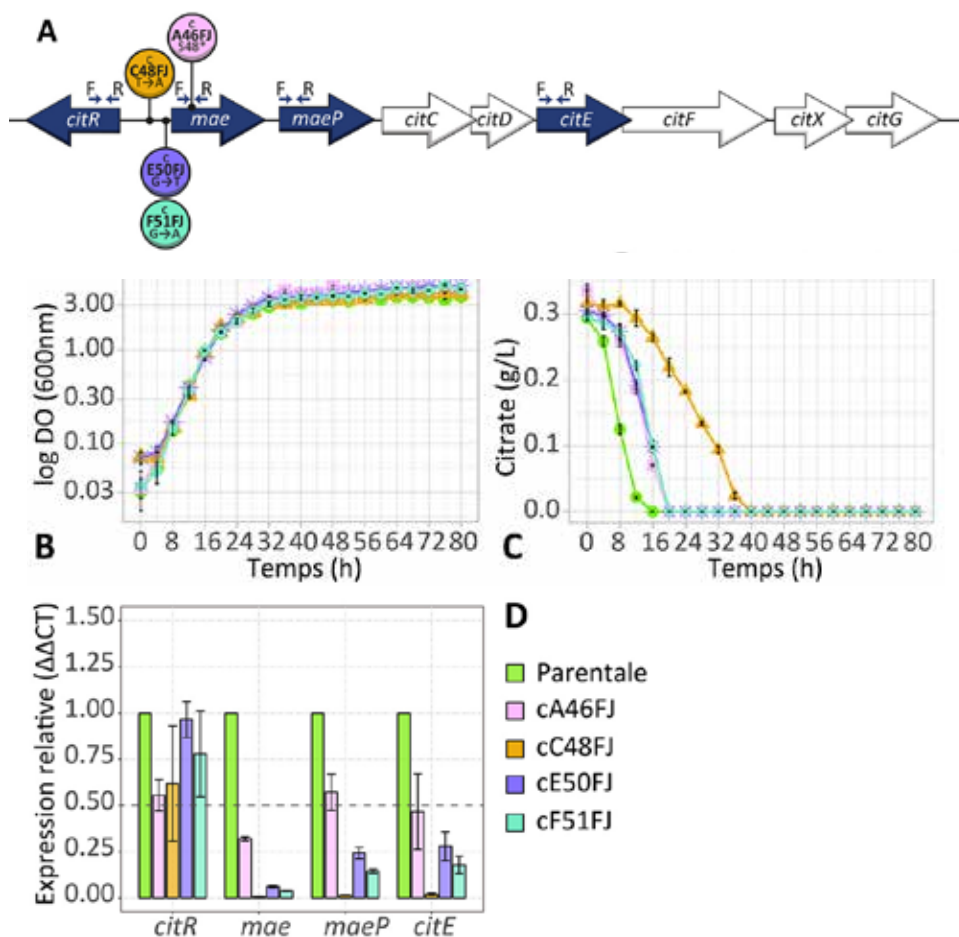


Figure 3 : Cinétique de consommation du citrate et expression du locus *cit* chez les clones évolués issus de l'évolution expérimentale de la souche ATCC BAA-1163.

(A) Les positions des mutations portées par les clones évolués cA46FJ, cC48FJ, cE50FJ et cF51FJ sur le locus *cit* sont représentées, ainsi que l'emplacement des amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR (D), F = Forward, R = Reverse. La croissance (B) et la consommation de citrate (C) ont été suivies chez les clones ainsi que chez la souche parentale cultivés en milieu GEMO pH 4,8. Après 24 h de croissance, l'ARN de ces souches a été extrait pour quantifier l'expression du locus *cit* par RT-qPCR (D). La méthode de Livak ou $2^{-\Delta\Delta CT}$ a été employée (Schmittgen and Livak, 2008). Les gènes de ménage sont *ldh* et *gyrA*. Les résultats ont été obtenus à partir de triplicats biologiques ($n=3$) analysés deux fois sur la même plaque (duplicats technique). Les différences significatives sont basées sur le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Bien que la croissance soit similaire entre les différentes souches, cette expérience montre que la consommation de citrate est bien plus lente chez les clones évolués comparés à la souche parentale, cC48FJ étant la plus impactée par la mutation dans la cinétique de consommation (Figure 3C).

En ce qui concerne l'expression des gènes de l'opéron citrate, une analyse RT-qPCR a été réalisée sur les gènes *citR*, *mae*, *maeP* et *citE*. La méthode de Livak ou $2^{-\Delta\Delta CT}$ a été employée, avec la souche parentale comme référence (Figure 3D) (Schmittgen and Livak, 2008). On remarque que le nombre de transcrits quantifiés pour les gènes testés est significativement plus faible chez les clones évolués que chez la souche parentale (expression relative inférieure à 0,5), excepté pour *citR*. De plus, l'expression de l'opéron semble beaucoup plus faible chez cC48FJ et plus importante chez cA46FJ, chez qui l'expression des gènes *maeP* et *citE* n'est pas significativement différente de la souche parentale (Figure 3D). Ceci est en cohérence avec la vitesse de consommation du citrate évaluée plus tôt (Figure 3C). Ainsi, les mutations portées par les clones évolués entraînent une dérégulation de l'expression de l'opéron citrate et la mutation portée par le clone évolué cC48FJ est celle qui impacte le plus l'expression de l'opéron (mutation sur la séquence du -10 du promoteur en amont de *mae*, Figure 3A). Ceci entraîne un ralentissement de la consommation du citrate chez ces populations évoluées. Ces résultats semblent corrélés avec l'acidotolérance de chaque clone. En effet, plus la souche consomme lentement le citrate, plus son développement à bas pH en présence de citrate est optimal (Figure 2). Ces résultats confortent un possible lien entre vitesse de consommation du citrate et acidotolérance chez *O. oeni*.

3.2 Régulation de l'expression du locus *cit* chez *O. oeni* (Eicher et al., submitted)

Les précédents résultats nous ont amenés à nous intéresser au mécanisme de régulation de l'expression du locus *cit* chez *O. oeni*. Un premier travail a consisté en la localisation des sites de démarrage de transcription (+1) sur le locus. Deux sites ont été localisés par la technique 5'-RACE (Matteau and Rodrigue, 2015; Tillett et al., 2000). Le premier, situé en amont de *mae*, assure la transcription du cluster *maemaePcitCDEFXG*. Le deuxième, en position divergente, permet la transcription de *citR*.

Un intérêt particulier a été porté sur le gène *citR*, codant le régulateur transcriptionnel putatif de l'opéron. Chez d'autres bactéries lactiques, l'homologue de ce gène code un activateur transcriptionnel (Blancato et al., 2008; de Felipe et al., 1994; Martin et al., 2005). Afin d'identifier le rôle de ce régulateur chez *O. oeni*, deux souches ont été spécifiquement sélectionnées pour la présence d'une variabilité génétique au sein de leur gène *citR* pouvant grandement affecter l'activité de la protéine associée : (i) ATCC BAA-1163, portant une mutation non-sens (L256*) dans la phase codante du gène rendant la protéine non fonctionnelle ; (ii) NB_1858, portant une mutation faux-sens (I7T) dans la phase codante du gène, pour qui l'analyse de la séquence protéique de CitR prédit une forte interaction avec l'ADN comparé à son homologue de la souche PSU-1, qui sera la souche utilisée comme référence. Dans un premier temps, la consommation de citrate a été suivie pour les 3 souches en conditions optimales de croissance (milieu GEMO, pH 4,8) (Figures 4A, B et C). La souche ATCC BAA-1163 est celle qui consomme le citrate le plus rapidement (fin de consommation après 16h de croissance) alors que la souche NB_1858 est celle qui consomme le plus lentement (fin de consommation après 36 h de croissance).

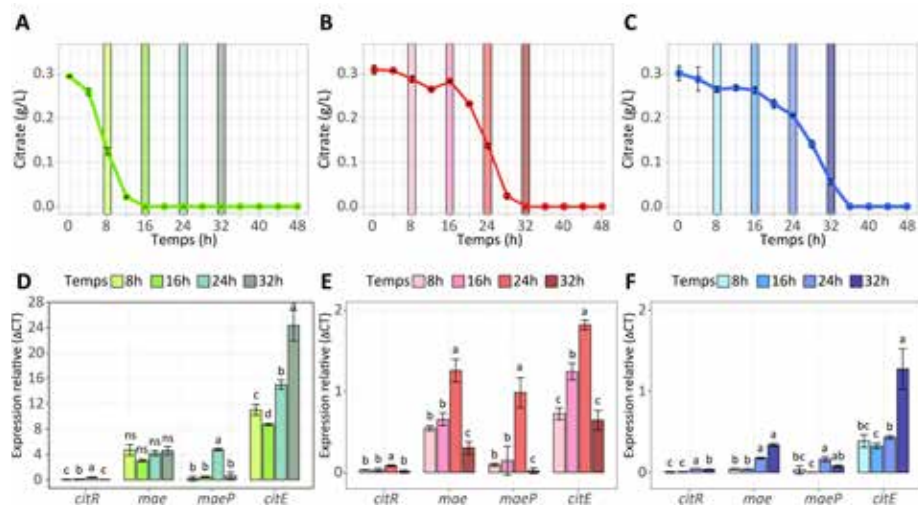


Figure 4 : Cinétique de consommation du citrate et expression du locus *cit* chez les souches ATCC BAA-1163, PSU-1 et NB_1858.

ATCC BAA-1163 (vert), PSU-1 (rouge) et NB_1858 (bleu) ont été cultivées en milieu GEMO pH 4,8. Leur consommation de citrate a été suivie toutes les 4 heures (A, B, C). Les ARN totaux ont été extraits de chaque souche après 8, 16, 24 et 32 h de croissance pour l'analyse RT-qPCR (D, E, F). La méthode 2- Δ Ct a été employée (Riedel et al., 2014 ; Schmittgen and Livak, 2008). Les gènes de ménage sont *ldh* et *gyrA*. Les résultats ont été obtenus à partir de triplicats biologiques (n=3) analysés deux fois sur la même plaque (duplicats technique). Les différences significatives sont basées sur le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

L'expression du locus *cit* a ensuite été suivie dans le temps par RT-qPCR chez les trois souches sélectionnées. Pour ce faire, les ARN totaux des 3 souches ont été extraits après 8, 16, 24 et 32 heures de croissance, couvrant toute la cinétique de consommation du citrate, avant de procéder à l'analyse (Figures 4D, E et F). La méthode 2- Δ Ct a été employée, avec pour référence les deux gènes de ménage *ldh* et *gyrA* (Riedel et al., 2014; Schmittgen and Livak, 2008). On remarque ainsi qu'un plus grand nombre de transcrits a pu être quantifié chez la souche ATCC BAA-1163, tout particulièrement pour les gènes *mae*, *maeP* et *citE*. Par exemple, une expression relative comprise entre 3,03 et 4,71 est calculée pour le gène *mae* en fonction du temps de croissance chez ATCC BAA-1163 contre entre 0,3 et 1,26 chez PSU-1, la souche de référence. À l'inverse, moins de transcrits ont pu être quantifiés chez la souche NB_1858, avec une expression relative calculée pour le gène *mae* située entre 0,04 et 0,34 en fonction du temps de croissance. Ceci est en corrélation avec la consommation de citrate de chaque souche : plus le locus *cit* est exprimé, plus la consommation de citrate est rapide.

Pour rappel, ATCC BAA-1163 possède une mutation engendrant une protéine CitR non fonctionnelle. D'un autre côté, la mutation portée par NB_1858 pourrait renforcer la liaison de son CitR à l'ADN, qui aurait donc une action plus forte que chez la souche de référence. Aux vues des résultats précédents, nous en avons déduit que CitR pourrait agir comme un répresseur transcriptionnel chez *O. oeni*. Pour vérifier cette hypothèse, la complémentation de la souche ATCC BAA-1163 avec un gène *citR* fonctionnel a été initiée, afin de voir si la présence de CitR induit un ralentissement de la consommation du citrate. Très peu d'outils génétiques sont actuellement disponibles pour la modulation d'expression de gènes chez *O. oeni*. La seule technique qui a fait ses preuves est le RNA silencing, consistant à faire exprimer par le biais d'un plasmide un ARN antisens complémentaire à l'ARN messager (ARNm) d'un gène cible, afin de diminuer son expression (Darsonval et al., 2018, 2015). Pour cette expérience, nous avons utilisé le même vecteur utilisé pour la technique du RNA silencing, nommé pSIPSYN. Ce plasmide est capable de

se répliquer et d'être exprimé chez *O. oeni*. Au lieu d'insérer un antisens, nous avons cette fois-ci inséré devant le promoteur du plasmide la séquence du gène *citR* issue soit (i) de la souche PSU-1, (ii) soit de la souche NB_1858, qui devrait donc avoir une action plus forte sur l'expression de l'opéron citrate. La souche ATCC BAA-1163 a donc été transformée avec les trois vecteurs suivants : pSIPSYN + *citR* de PSU-1, pSIPSYN + *citR* de NB_1858 ou alors pSIPSYN vide, qui servira de contrôle. Les trois mutants ainsi obtenus, respectivement nommés OocitR-PSU, OocitR-NB et Ooc, ont été mis en croissance en conditions optimales (milieu GEMO, pH 4,8) et la consommation de citrate ainsi que l'expression du locus *cit* ont été suivies au cours du temps (Figure 5).

Bien que la croissance des trois mutants soit similaire (Figure 5A), on remarque un ralentissement de la consommation du citrate chez les deux mutants complémenés (Figure 5B). Ce ralentissement est plus important chez OocitR-NB, confirmant l'action plus forte de CitR issu de la souche NB_1858 sur l'expression du locus *cit*. L'analyse RT-qPCR (méthode 2- Δ Ct), réalisée après 8 et 24 heures de croissance, confirme que ce ralentissement est dû à une expression de l'opéron citrate plus faible chez les deux mutants complémenés (expression relative inférieure à 0,5) (Figure 5C et D). Ainsi, ces résultats semblent confirmer le rôle de répresseur transcriptionnel de CitR chez *O. oeni*.

Pour finir, l'acido-tolérance de ces mutants a été mesurée par un suivi de croissance dans le milieu GEMO dont le pH a été ajusté à 3 (données non représentées). La biomasse finale produite par les deux mutants complémenés est significativement plus importante que la souche contrôle (DO maximale = 0,298 pour OocitR-PSU et 0,415 pour OocitR-NB, contre seulement 0,188 pour Ooc). Ainsi, par cette expérience, nous montrons une fois de plus la corrélation entre vitesse de consommation du citrate et acido-tolérance chez *O. oeni*.

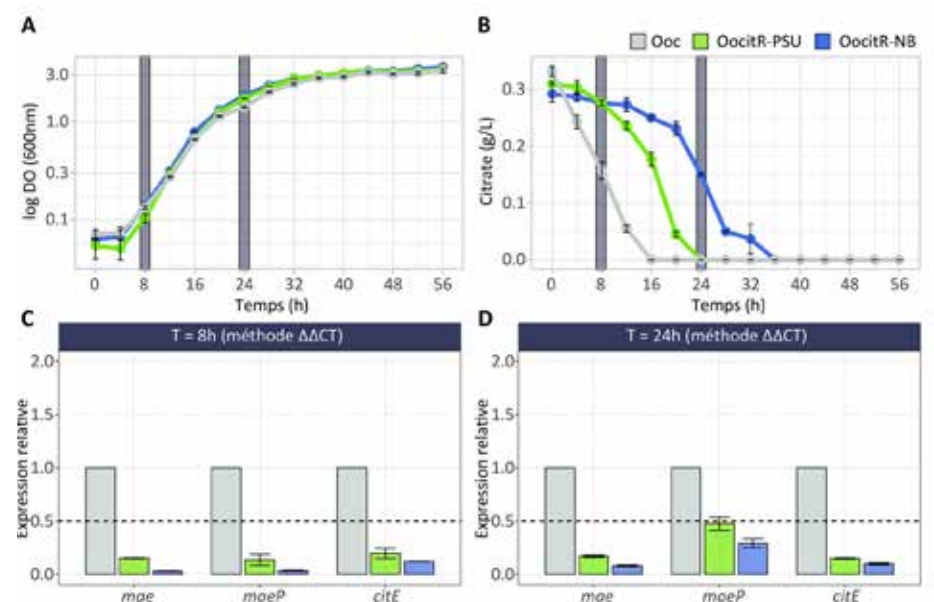


Figure 5 : Cinétique de consommation du citrate et expression de l'opéron citrate chez la souche ATCC BAA-1163 complémenée avec un *citR* fonctionnel.

Les mutants ont été cultivés en milieu GEMO pH 4,8. Leur croissance (A) et leur consommation de citrate (B) ont été suivies toutes les 4 heures. Les ARN totaux ont été extraits de chaque souche après 8h (C) et 24h (D) de croissance pour l'analyse RT-qPCR. La méthode de Livak ou 2- Δ Ct a été employée (Schmittgen and Livak, 2008). Les gènes de ménage sont *ldh* et *gyrA*. Les résultats ont été obtenus à partir de triplicats biologiques (n=3) analysés deux fois sur la même plaque (duplicats technique). Les différences significatives sont basées sur le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

3.3 Influence du pH sur le métabolisme de *O. oeni* : comment le métabolisme du citrate peut-il influencer l'acido-tolérance? (Eicher et al., 2024b)

Les deux expériences précédentes établissent un lien de cause à effet entre la vitesse de consommation de citrate et l'acido-tolérance de la souche ATCC BAA-1163. Ceci pourrait être applicable à d'autres souches de *O. oeni*. En effet, nous avons réalisé une comparaison génomique entre 30 souches différentes qui a montré une grande diversité génétique au niveau du locus *cit*. Plusieurs d'entre elles possèdent des mutations pouvant potentiellement compromettre leur consommation du citrate. Ceci pourrait démontrer qu'au cours du temps, les souches ont évoluées vers la perte ou l'altération du métabolisme du citrate afin de s'adapter à une niche écologique particulière. Pour aller plus loin, le métabolisme de 11 souches de provenance différente (Vins et kombucha) et appartenant aux groupes phylogénétiques A, B ou D a été comparé. En plus du métabolisme du citrate, le métabolisme du malate et des sucres (glucose/fructose) a également été suivi, étant donné que ces trois métabolismes partagent des réactions communes et sont étroitement liés les uns aux autres. Cette expérience a été réalisée en milieu GEMO, un milieu qui permet d'optimiser la croissance de toutes les souches étudiées, et dont le pH a été ajusté à 4,8 (conditions optimales de croissance), 3,6 (conditions acides) ou 3,2 (conditions très acides). Elle met en évidence que toutes les souches étudiées consomment les substrats de manière séquentielle : d'abord le malate, puis le citrate et enfin les sucres, ce qui est en accord avec de précédentes études (Contreras et al., 2018; Saguir and Manca De Nadra, 2002; Viljakainen and Laakso, 2000). Elle souligne également une grande variabilité au niveau du métabolisme en fonction du groupe phylogénétique de la souche, les souches appartenant aux groupes B et D consommant plus vite les sucres et le citrate que les souches du groupe A. Ces dernières sont des souches retrouvées majoritairement en vin, tandis que les souches des groupes B et C sont principalement retrouvées au cours du processus de fabrication du cidre et les souches du groupe D dans la kombucha (Balmaseda et al., 2023; Lorentzen et al., 2019; Lorentzen and Lucas, 2019). De ce fait, ces souches ne sont pas confrontées aux mêmes conditions environnementales, avec d'un côté un milieu très pauvre en nutriments et riche en éthanol (vin) et de l'autre un environnement plus riche en nutriments et moins riche en éthanol, mais où la compétition avec les autres microorganismes pour les sources carbonées est plus féroce (cidre, kombucha). Les différences observées au niveau du métabolisme sont donc probablement liées aux conditions de vie de chaque souche.

Le suivi de ces métabolismes a également mis en évidence la capacité de *O. oeni* à pouvoir « recycler » certains métabolites produits par la bactérie. En effet, il apparaît qu'elle est capable de métaboliser le L-lactate (issus du métabolisme du malate) et le mannitol (issus du métabolisme du fructose). En faisant cela, elle serait capable de produire de nouveau de l'ATP alors même qu'elle a épuisé le milieu de culture en malate, citrate et sucre, ses principales sources de carbone. De plus, il a été montré que le L-lactate en grande concentration pouvait inhiber la croissance de *O. oeni* (Bauer and Dicks, 2004), sa consommation permettrait en quelque sorte de détoxifier son environnement pour limiter l'impact sur sa croissance.

Concernant le lien entre métabolisme ralenti du citrate et acido-tolérance chez *O. oeni*, plusieurs hypothèses ont pu être posées à l'issue de ces travaux. Pour cette partie, le travail s'est concentré sur 7 souches, toutes appartenant au groupe A, mais dont la vitesse de consommation de citrate diffère (4 souches = PSU-1, NB_1911,

IOEB_S450 et 26.1 consommant le citrate de manière standard et 3 souches = NB_1858, 23.1 et 32.2 consommant le citrate de manière significativement plus lente, dû à des variabilités génétiques). Dans un premier temps, la quantité finale de substrats consommés (citrate, malate, glucose, fructose) et de produits synthétisés (lactate, acétate, mannitol) a été calculée pour ces différentes souches (Figure 6). À pH 3,6 (soit en condition acide), on remarque que pour une concentration de substrats consommés relativement similaire entre les 4 souches dites « standard » et les souches dites « ralenties » 23.1 et 32.2, une concentration significativement plus importante de produits synthétisés a pu être détectée, notamment pour le mannitol et le D-lactate, mettant en lumière une potentielle réorientation du métabolisme chez ces souches par rapport aux souches standards. De plus, la souche NB_1858, elle aussi ralentie, a été en mesure de consommer davantage de substrats que toutes les autres souches. À la fin de la cinétique, les 3 souches ralenties ont produit significativement plus de biomasses que les souches standards. De ce fait, un ralentissement du métabolisme du citrate engendrerait une réorientation des flux métaboliques qui serait à l'origine d'une meilleure croissance à bas pH.

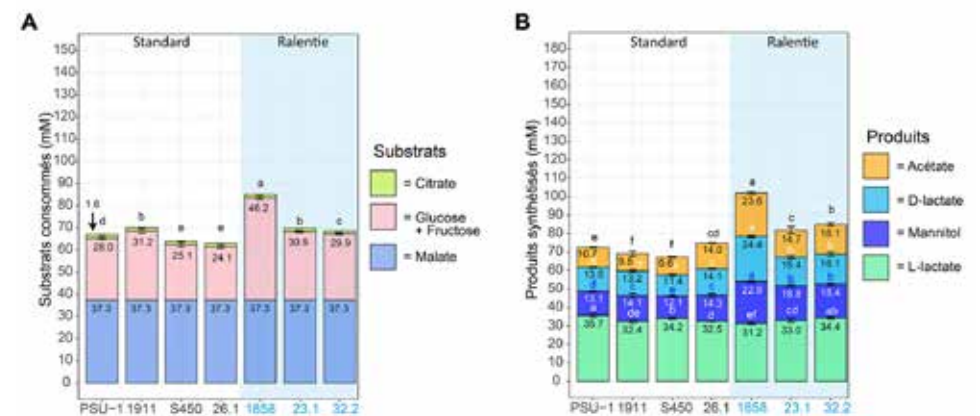


Figure 6 : Substrats consommés et produits synthétisés par différentes souches de *O. oeni* après croissance en milieu GEMO pH 3,6.

La quantité de substrats consommés (A) et de produits synthétisés (B) en mM est indiquée pour chaque souche (en blanc = consomme le citrate de manière standard / en bleu = consomme le citrate de manière ralentie) après 80 h de croissance en milieu GEMO dont le pH a été ajusté à 3,6. Les différences significatives sont basées sur le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Chez *O. oeni*, la consommation d'une mole de citrate abouti à la production d'une mole d'acétate et une mole de pyruvate. Ce pyruvate peut ensuite être orienté vers plusieurs voies métaboliques (Figure 1) :

Pour la production de D-lactate, permettant la réoxydation d'un co-facteur

Pour la production d'acétate, permettant la production d'ATP

Pour la production de diacétyle, acétoïne et butane-2,3-diol

Cette dernière voie serait utilisée par les bactéries pour l'élimination rapide du pyruvate, puisque deux moles de pyruvate sont nécessaires pour produire une mole d' α -acétolactate. En effet, il a été démontré chez une autre bactérie lactique, *Lactococcus lactis*, que l'accumulation de pyruvate peut devenir toxique à bas pH (Zuljan et al., 2014). Aussi, la production de D-lactate, d'acétate et de diacétyle/acétoïne (c.-à-d. les deux produits issus de l' α -acétolactate) a été suivie au cours du temps chez deux souches standards (PSU-1 et NB_1911) et deux souches dont le métabolisme est ralenti (NB_1858 et 23.1). Lors de la phase de consommation de citrate, on constate que les deux souches lentes à métaboliser ont produit plus de D-lactate et moins de diacétyle/acétoïne (données non représentées) (Eicher et

al., 2024b). On constate également que ces deux souches ont été en mesure de consommer plus d'hexoses que les deux souches standards, principalement du fructose.

De ce fait, un ralentissement du métabolisme du citrate pourrait être à l'origine d'une réorientation du pyruvate produit vers la production de D-lactate à l'instar de la production de diacétyle/acétoïne. En effet, l'enzyme à l'origine de la conversion du pyruvate vers le D-lactate, la D-lactate déshydrogénase (Figure 1), est moins active à bas pH. Lorsqu'une grande quantité de pyruvate est produite par la consommation rapide de citrate, celui-ci doit être rapidement métabolisé pour éviter l'effet toxique qu'il pourrait avoir s'il se retrouve accumulé dans la cellule. C'est la raison pour laquelle il serait principalement orienté vers la production de diacétyle/acétoïne dans les souches standards. Chez les souches métabolisant lentement le citrate, la cinétique de consommation préviendrait l'effet toxique du pyruvate, qui pourrait alors être lentement métabolisé en D-lactate. Cette réorientation permettrait la réoxydation de co-facteurs essentiels à la voie de la phosphocétolase (voie de consommation des hexoses chez *O. oeni*, (Figure 1), qui serait alors activée. Cette voie étant à l'origine de la production d'ATP, ceci pourrait expliquer comment les souches qui métabolisent lentement le citrate ont été en mesure de pouvoir se développer plus rapidement que les souches standards à bas pH.

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'évolution expérimentale réalisée sur la souche de *O. oeni* ATCC BAA-1163 a montré l'apparition systématique de mutations dans le locus *cit* au cours du processus d'évolution. Ces mutations engendrent un ralentissement de la consommation de citrate chez les populations évoluées obtenues, dû à une dérégulation de l'expression des gènes de l'opéron citrate. Le ralentissement de la consommation de citrate optimise l'acido-tolérance de la souche ATCC BAA-1163.

Ces résultats ont amené à explorer la régulation de l'expression de ce locus chez *O. oeni*. L'implication de la protéine CitR en tant que répresseur transcriptionnel de l'opéron a pu être mise en évidence notamment grâce à une complémentation génétique de la souche ATCC BAA-1163, technique qui n'avait encore jamais été réalisée avec succès sur *O. oeni* auparavant. Au cours de ces travaux, la présence d'un ARN antisens complémentaire à la région 5' du gène *mae* a également été révélée. Cet antisens pourrait être à l'origine d'un deuxième système de régulation de l'expression du locus *cit*. En effet, des résultats de RT-qPCR réalisés sur les trois souches étudiées PSU-1, NB_1858 et ATCC BAA-1163 ont permis de mettre en évidence une régulation particulière de l'expression du gène *maeP* en comparaison avec les autres gènes (données non représentées). L'hypothèse est que ce gène serait soumis à une régulation post-transcriptionnelle via l'action d'endonucléases. Ces dernières cliveraient l'ARNm au niveau de *maeP* en début de croissance des bactéries, permettant de limiter le transport et donc la consommation de citrate. Par une régulation qui reste encore inconnue, l'expression de l'antisens serait induite en milieu de croissance (qui semble correspondre au moment où l'acide malique est complètement consommé). La fixation de cet antisens à *mae* permettrait d'induire une modification de la structure secondaire du messenger *maePcitCDEFXG*. Ainsi, les endonucléases ne pourraient plus cliver l'ARNm de *maeP*, induisant son expression et permettant l'initiation de la consommation de citrate. Cette hypothèse devra être vérifiée à l'avenir par le biais de différentes expériences (détection de l'expression de l'antisens et diminution de son expression via la technique de RNA silencing).

Le métabolisme du citrate, du malate et des sucres a été exploré chez des souches de *O. oeni* aux origines diverses. Ce travail a montré que les cinétiques de consommation des substrats variaient grandement d'une souche à l'autre, qui pourrait être expliqué par la différence d'écosystèmes rencontrés par chacune d'entre elles. De plus, ce travail a mis en lumière la capacité de *O. oeni* à métaboliser certains produits de son métabolisme tels que l'acide L-lactique et le mannitol, lui permettant de créer un pool d'ATP supplémentaire même lorsque la totalité des sources de carbone est épuisée. Enfin l'augmentation de l'acido-tolérance induite par le ralentissement de la consommation du citrate pourrait être expliquée par une modification des flux métaboliques dans la cellule qui optimiserait la production d'ATP et le maintien de la balance redox. L'expérience présentée ici a été réalisée à pH 3,6, mais la même expérience a également été faite à pH beaucoup plus bas (3,2) afin de se rapprocher des conditions qui peuvent poser des problèmes de fermentation en vin. À l'issue de cette expérience, une autre hypothèse a pu être émise, en lien avec l'expression du gène *mae* qui intervient non seulement dans le métabolisme du citrate, mais aussi celui du malate. En effet, une diminution de l'expression de ce gène pourrait permettre d'optimiser la fermentation malolactique (Eicher et al., 2024b) et donc la

prospérité de la bactérie à bas pH.

Ces travaux amènent de nouvelles connaissances sur les mécanismes par lesquels *O. oeni* s'adapte à son environnement. Ici, c'est son métabolisme du citrate qui a été minutieusement étudié. Celui-ci suscitait d'ores et déjà un intérêt certain puisqu'il est à l'origine de la production de diacétyle, composé aromatique apportant des notes beurrées au vin, et donc désiré en très faibles quantités. Ces travaux ont montré que non seulement le ralentissement du métabolisme du citrate chez *O. oeni* pouvait porter un intérêt de par la moindre production de diacétyle, mais que cela permet également d'optimiser la survie de la bactérie dans les vins aux pH acides. Ainsi, lors de la sélection de nouveaux ferments malolactiques, un intérêt tout particulier devra être porté au métabolisme du citrate et à la séquence du locus *cit*.

Enfin, une seconde évolution expérimentale a été initiée avec une souche commerciale dans des conditions relativement similaires à la première évolution. Les mutations acquises par les populations évoluées obtenues ne ciblent pas les mêmes gènes ou voies métaboliques comparés à l'évolution menée avec la souche ATCC BAA-1163, et de futures recherches seront donc menées pour comprendre comment ces métabolismes peuvent être impliqués dans la réponse au stress acide de *O. oeni*. Aussi, cette évolution a donné lieu à l'obtention de bactéries qui pourraient avoir le potentiel d'être utilisées comme futurs ferments malolactiques, ce pour quoi un dépôt d'invention a été effectué.

Fort de deux expériences d'évolution expérimentales réalisées sur *O. oeni*, un certain savoir-faire a été acquis par notre laboratoire au cours de ces dernières années. Grâce à cela, les conditions d'évolution pourraient être optimisées à l'avenir pour envisager l'adaptation de cette bactérie d'intérêt œnologique à d'autres paramètres pouvant être une source de stress, tel que l'éthanol, la température ou la présence de sulfites. Plusieurs perspectives sont envisagées, notamment l'adaptation de souches provenant de groupes génétiques différents (et donc au fond génétique différent) dans les mêmes conditions afin de comparer les chemins évolutifs entrepris par chacune d'entre elles. D'un point de vue plus appliqué, l'adaptation d'une souche à l'éthanol est une piste envisagée puisqu'en raison du réchauffement climatique, la teneur en alcool des vins a tendance à augmenter. Ceci est dû à un avancement du cycle biologique de la vigne, entraînant une modification de la composition chimique des raisins au moment de la vendange, qui contiennent notamment plus de sucres (Renée Mozell and Thach, 2014; van Leeuwen and Destrac-Irvine, 2017). Obtenir des souches plus résistantes va donc s'avérer essentiel pour assurer la fermentation dans de nouvelles conditions. Aussi, les populations obtenues à l'issue de la seconde expérience d'évolution expérimentale, déjà adaptée à l'acidité, pourraient être utilisées pour cette nouvelle expérience afin d'obtenir des souches adaptées aux deux principaux paramètres (pH et éthanol) responsables de la plupart des arrêts de fermentation en vin.

BIBLIOGRAPHIE

- Agree TE, Henick-Kling T. 1998.** Modification of wine flavor by malolactic fermentation. The management of malolactic fermentation and quality of wine. Lallemand. pp. 17–22.
- Alexandre H, Grandvalet C, Guilloux-Benatier M, Remize F, Tourdot-Maréchal R. 2008.** Les bactéries lactiques en œnologie. Paris, France: Lavoisier.
- Augagneur Y, Ritt J-F, Linares DM, Remize F, Tourdot-Maréchal R, Garmyn D, Guzzo J. 2007.** Dual effect of organic acids as a function of external pH in *Oenococcus oeni*. Arch Microbiol 188:147–157. doi:10.1007/s00203-007-0230-0
- Balmaseda A, Lorentzen M, Dutilh L, Bauduin R, Guichard H, Ollivier S, Miot-Sertier C, Lucas PM. 2023.** Alcoholic fermentation drives the selection of *Oenococcus oeni* strains in wine but not in cider. Int J Food Microbiol 400:110276. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110276
- Bartowsky EJ, Henschke PA. 2004.** The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. Int J Food Microbiol 96:235–252. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013
- Bauer R, Dicks LMT. 2004.** Control of malolactic fermentation in wine. A review. South Afr J Enol Vitic 25:74–88. doi:10.21548/25-2-2141
- Bech-Terkilsen S, Westman JO, Swiegers JH, Siegumfeldt H. 2020.** *Oenococcus oeni*, a species born and moulded in wine: a critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses. Aust J Grape Wine Res 26:188–206. doi:10.1111/ajgw.12436
- Bellanger T, da Silva Barreira D, Wien F, Delarue P, Senet P, Rieu A, Neiers F, Varela PF, Combet S, Weidmann S. 2023.** Significant influence of four highly conserved amino-acids in lipochaperon-active sHsps on the structure and functions of the Lo18 protein. Sci Rep 13:19036. doi:10.1038/s41598-023-46306-6
- Bennett AF, Dao KM, Lenski RE. 1990.** Rapid evolution in response to high-temperature selection. Nature 346:79–81. doi:10.1038/346079a0
- Betteridge AL, Sumbly KM, Sundstrom JF, Grbin PR, Jiranek V. 2017.** Application of directed evolution to develop ethanol tolerant *Oenococcus oeni* for more efficient malolactic fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 102:921–932. doi:10.1007/s00253-017-8593-x
- Blancato VS, Repizo GD, Suárez CA, Magni C. 2008.** Transcriptional regulation of the citrate gene cluster of *Enterococcus faecalis* involves the GntR family transcriptional activator CitO. J Bacteriol 190:7419–7430. doi:10.1128/JB.01704-07
- Cavin JF, Prevost H, Lin J, Schmitt P, Divies C. 1989.** Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. Appl Environ Microbiol 55:751–753. doi:10.1128/AEM.55.3.751-753.1989
- Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal P-A, Guzzo J. 2005.** Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr 1717:118–124. doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.015
- Contreras A, Ribbeck M, Gutiérrez GD, Cañon PM, Mendoza SN, Agosin E. 2018.** Mapping the physiological response of *Oenococcus oeni* to ethanol stress using an extended genome-scale metabolic model. Front Microbiol 9:291. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00291
- Darsonval M, Alexandre H, Grandvalet C. 2016.** Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of *estA2* and *estA7* esterase genes on wine ester profile. Food Microbiol 60:21–28. doi:10.1016/j.fm.2016.06.012
- Darsonval M, Julliat F, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C. 2018.** CtsR, the master regulator of stress-response in *Oenococcus oeni*, is a heat sensor interacting with ClpL1. Front Microbiol 9:3135. doi:10.3389/fmicb.2018.03135
- Darsonval M, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C. 2015.** The antisense RNA approach: a new application for in vivo stress response investigation in *Oenococcus oeni*. Appl Environ Microbiol 82:18–26. doi:10.1128/AEM.02495-15
- Darwin C. 1831.** On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. Lond Murray.
- de Felipe FL, Magni C, de Mendoza D, López P. 1994.** Citrate utilization gene cluster of the *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis: organization and regulation of expression. Mol Gen Genet MGG 246:590–599. doi:10.1007/BF00298965
- Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD. 1995.** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol 45:395–397. doi:10.1099/00207713-45-2-395
- Eicher C, Coulon J, Favier M, Alexandre H, Reguant C, Grandvalet C. 2024a.** Citrate metabolism in lactic acid bacteria: is there a beneficial effect for *Oenococcus oeni* in wine? Front Microbiol 14:1283220. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1283220
- Eicher C, Tran T, Munier E, Coulon J, Favier M, Alexandre H, Reguant C, Grandvalet C. 2024b.** Influence of pH on *Oenococcus oeni* metabolism: can the slowdown of citrate consumption improve its acid tolerance? Food Res Int 114027. doi:10.1016/j.foodres.2024.114027

BIBLIOGRAPHIE (SUITE)

Fornachon JCM, Lloyd B. 1965. Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. J Sci Food Agric 16:710–716. doi:10.1002/jsfa.2740161204

Garvie EI. 1967. *Leuconostoc oenos* sp.nov. J Gen Microbiol 48:431–438. doi:10.1099/00221287-48-3-431

Grandvalet C. 2011. Bases moléculaires de la réponse aux stress chez *Oenococcus oeni*, une bactérie d'intérêt oenologique. Dijon: Université de Bourgogne.

Grandvalet C, Assad-García JS, Chu-Ky S, Tollot M, Guzzo J, Gresti J, 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 154:2611–2619. doi:10.1099/mic.0.2007/016238-0

Grandvalet C, Coucheney F, Beltramo C, Guzzo J. 2005. CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. J Bacteriol 187:5614–5623. doi:10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005

Harden MM, He A, Creamer K, Clark MW, Hamdallah I, Martinez KA, Kresslein RL, Bush SP, Slonczewski JL. 2015. Acid-adapted strains of *Escherichia coli* K-12 obtained by experimental evolution. Appl Environ Microbiol 81:1932–1941. doi:10.1128/AEM.03494-14

Jiang J, Sumby KM, Sundstrom JF, Grbin PR, Jiranek V. 2018. Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment. Food Microbiol 73:150–159. doi:10.1016/j.fm.2018.01.005

Julliat F. 2020. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et évolution expérimentale. Dijon: Université de Bourgogne.

Julliat F, Eicher C, Tourti N, Glaser P, Cabanel N, Coulon J, Favier M, Alexandre H, Reguant C, Guyot S, Grandvalet C. 2023. Experimental evolution forcing *Oenococcus oeni* acid tolerance highlights critical role of the citrate locus. Res Microbiol 174:104048. doi:10.1016/j.resmic.2023.104048

Kang TS, Korber DR, Tanaka T. 2013. Contributions of citrate in redox potential maintenance and ATP production: metabolic pathways and their regulation in *Lactobacillus panis* PM1. Appl Microbiol Biotechnol 97:8693–8703. doi:10.1007/s00253-013-5108-2

König H, Fröhlich J. 2017. Lactic Acid Bacteria. In: König H, Unden G, Fröhlich J, editors. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Cham: Springer International Publishing. pp. 3–41. doi:10.1007/978-3-319-60021-5_1

Lerm E, Engelbrecht L, Du Toit M. 2010. Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. South Afr J Enol Vitic 31:186–212. doi:10.21548/31-2-1417

Lindahl T, Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 11:3610–3618. doi:10.1021/bi00769a018

Lonvaud-Funel A. 2015. Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in wine. In: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editors. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Wiley. pp. 231–247. doi:10.1002/9781118868386.ch15

Lorentzen MP, Campbell-Sills H, Jorgensen TS, Nielsen TK, Coton M, Coton E, Hansen L, Lucas PM. 2019. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. BMC Genomics 20:330. doi:10.1186/s12864-019-5692-3

Lorentzen MPG, Lucas PM. 2019. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. Appl Microbiol Biotechnol 103:2937–2945. doi:10.1007/s00253-019-09689-z

Loubiere P, Salou P, Leroy MJ, Lindley ND, Pareilleux A. 1992. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. J Bacteriol 174:5302–5308. doi:10.1128/jb.174.16.5302-5308.1992

Maicas S, Pardo I, Ferrer S. 2000. The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. Int J Food Sci Technol 35:75–79. doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00359.x

Maitre M, Weidmann S, Rieu A, Fenel D, Schoehn G, Ebel C, Coves J, Guzzo J. 2012. The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection. Biochem J 444:97–104. doi:10.1042/BJ20120066

Marcobal AM, Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, Mills DA. 2008. Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. J Bacteriol 190:564–570. doi:10.1128/JB.01457-07

Martin MG, Magni C, de Mendoza D, López P. 2005. CitI, a transcription factor involved in regulation of citrate metabolism in Lactic Acid Bacteria. J Bacteriol 187:5146–5155. doi:10.1128/JB.187.15.5146-5155.2005

Matteau D, Rodrigue S. 2015. Precise identification of genome-wide transcription start sites in bacteria by 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE). In: Leblanc BP, Rodrigue S, editors. DNA-Protein Interactions, Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. pp. 143–159. doi:10.1007/978-1-4939-2877-4_9

Mink R, Sommer S, Kölling R, Schmarr H-G, Scharfenberger-Schmeer M. 2014. Time course of diacetyl formation during vinification with *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* co-cultivation: Diacetyl formation during vinification. Aust J Grape Wine Res 20:194–198. doi:10.1111/ajgw.12076

Nielsen JC, Prah C, Lonvaud-Funel A. 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-fried *Leuconostoc oenos* cultures. Am J Enol Vitic 47:42–48. doi:10.5344/ajev.1996.47.1.42

Poolman B, Molenaar D, Smid EJ, Ubbink T, Abee T, Renault PP, Konings WN. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. J Bacteriol 173:6030–6037. doi:10.1128/jb.173.19.6030-6037.1991

Ramos A, Poolman B, Santos H, Lolkema JS, Konings WN. 1994. Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generates a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. J Bacteriol 176:4899–4905. doi:10.1128/jb.176.16.4899-4905.1994

Ramos A, Santos H. 1996. Citrate and sugar cofermentation in *Leuconostoc oenos*, a ¹³C Nuclear Magnetic Resonance study. Appl Env Microbiol 62:9. doi:https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2577-2585.1996

Renée Mozell M, Thach L. 2014. The impact of climate change on the global wine industry: challenges & solutions. Wine Econ Policy 3:81–89. doi:10.1016/j.wep.2014.08.001

Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M. 2014. An extended Δ CT-method facilitating normalisation with multiple reference genes suited for quantitative RT-PCR analyses of Human hepatocyte-like cells. PLoS ONE 9:e93031. doi:10.1371/journal.pone.0093031

Ruffner HP, Possner D, Brem S, Rast DM. 1984. The physiological role of malic enzyme in grape ripening. Planta 160:444–448. doi:10.1007/BF00429761

Saguir FM, Manca De Nadra MC. 2002. Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. J Appl Microbiol 93:295–301. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01698.x

Salema M, Lolkema JS, Romão MVS, Dias MCL. 1996. The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. J Bacteriol 178:3127–3132. doi:10.1128/jb.178.11.3127-3132.1996

Salou P, Loubiere P, Pareilleux A. 1994. Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. Appl Environ Microbiol 60:1459–1466. doi:10.1128/AEM.60.5.1459-1466.1994

Sauvageot F, Vivier P. 1997. Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four burgundy wines. Am J Enol Vitic 48:187–192. doi:10.5344/ajev.1997.48.2.187

Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73

Sugimoto S, Abdullah-Al-Mahin, Sonomoto K. 2008. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. J Biosci Bioeng 106:324–336. doi:10.1263/jbb.106.324

Tillett D, Burns BP, Neilan BA. 2000. Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping bacterial mRNA transcripts. BioTechniques 28:448–456. doi:10.2144/00283st01

Tourdot-Maréchal R, Fortier L-C, Guzzo J, Lee B, 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. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08694.x

Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Diviès C. 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. Int J Food Microbiol 55:269–273. doi:10.1016/S0168-1605(00)00202-6

van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Maguin E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. pp. 187–216.

van Leeuwen C, Destrac-Irvine A. 2017. Modified grape composition under climate change conditions requires adaptations in the vineyard. OENO One 51:147–154. doi:10.20870/oeno-one.2016.0.0.1647

Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M. 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. J Ind Microbiol Biotechnol 23:447–455. doi:10.1038/sj.jim.2900733

Viljakainen SK, Laakso SV. 2000. The use of malolactic *Oenococcus oeni* (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid. Eur Food Res Technol 211:438–442. doi:10.1007/s002170000217

Vivas N, Lonvaud-Funel A, Glories Y. 1997. Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. Food Microbiol 14:291–299. doi:10.1006/fmic.1996.0086

Zuljan FA, Repizo GD, Alarcon SH, Magni C. 2014. α -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. Int J Food Microbiol 188:99–107. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.017

Grand Prix 2023 - Antonin Douillet

*Etude pluriannuelle de la sporée aérienne de *Plasmopara viticola* par quantification moléculaire : un nouvel indicateur de risque des épidémies du mildiou de la vigne.*

Grand Prix 2022 - Charlotte Brault

Optimisation de la sélection de nouvelles variétés de vigne à l'aide de la prédiction génomique et phénotypique.

Grand Prix 2021 - Delphine Winstel

Recherches sur les composés du bois de chêne modulant la saveur des vins et des eaux-de-vie

Grand Prix 2019 - Yann Raineau

Défis environnementaux de la viticulture : une analyse comportementale des blocages et des leviers d'action.

Grand Prix 2017 - Liming Zeng

Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle

Grand Prix 2014 - Olivier Serra

Le législateur et le marché vinicole sous la Troisième République

Grand Prix 2013 – Dorothee Boyer-Paillard

Essai sur les notions d'origine et de provenance en droit du commerce, la reconnaissance juridique des « territoires des productions typiques »

Grand Prix 2012 – Guillaume Antalick

Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique, le rôle particulier des esters

Grand Prix 2011 – Axel Marchal

Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs

Grand Prix 2010 – Caroline Le Goffic

La protection des indications géographiques en France, dans la Communauté européenne et aux Etats-Unis

Grand Prix 2009 - Katharina Zott

Les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec Saccharomyces durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique

Grand Prix 2008 – Elise Sarrazin

*Recherches sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc
Caractérisation de composés clés et étude de leur genèse*

Grand Prix 2007 – Alexandre Pons

Recherche sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins blancs secs

Grand Prix 2006 - Paulo Lopes

Etude des phénomènes oxydatifs pendant le vieillissement des vins en bouteille. Rôle de l'obtuteur

Grand Prix 2005 - Stéphane La Guerche

Les défauts moisis terreux des vins : la géosmine identifiée comme principale responsable

Grand Prix 2004 - Michael Jourdes

Réactivité, sythèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagi tannins

Grand Prix 2003 Dominique Roujou de Boubée

Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisin et dans les vins

Grand Prix 2002 -- Catherine Peyrot des Gachons

*Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L.cv Sauvignon*

Grand Prix 2001 - René Siret

*Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins*

Grand Prix 2000 - Takatoshi Tominaga

*Recherches sur l'arôme variétal des vins de *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin*

Grand Prix 1999 - Isabelle Cutzach-Billard

Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation

Grand Prix 1998 - Virginie Moine-Ledoux

Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins

Grand Prix 1997 - Valérie Lavigne-Cruege

Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs

Grand Prix 1996 - Sylvie Biau

Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux

Grand Prix 1995 - Samuel Lubbers

Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme

Grand Prix 1994 - Ziya Günata

Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique

Grand Prix 1993 - Pierre-Louis Teissedre

Le plomb, du raisin au vin

Grand Prix 1992 - Pascal Chatonnet

Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques

Secrétariat de l'Académie Amorim

Emilie Loubié : +33 (0) 6 62 20 91 97

Email : emilie@academie-amorim.com

